UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1967-1968 N° 848

APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE FONCTIONNELLE SUR COUCHE MINCE AUX PRÉPARATIONS GALÉNIQUES À BASE D'ALCALOÏDES

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 23 Mars 1968

devant la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(Mention : PHARMACIE)

par

André KAESS

Pharmacien

Examinateurs de la Thèse :

MM. **Gérard GAZET DU CHATELIER**, Professeur, Président

Pierre DUQUÉNOIS, Professeur } Juges

Claude MATHIS, Maître de Conférences } Juges

1968

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1967-1968 N° 848

APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE FONCTIONNELLE SUR COUCHE MINCE AUX PRÉPARATIONS GALÉNIQUES À BASE D'ALCALOÏDES

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 23 Mars 1968

devant la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(Mention : **PHARMACIE**)

par

André KAESS

Pharmacien

Examinateurs de la Thèse :

MM. **Gérard GAZET DU CHATELIER**, Professeur, Président

Pierre DUQUÉNOIS, Professeur } Juges

Claude MATHIS, Maître de Conférences } Juges

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Doyen : M. M.HASSELMANN.

Doyen honoraire : M. P.DUQUÉNOIS.

Assesseur : M. J.SCHREIBER.

Professeurs :

MM. R.SARTORY	Bactériologie et Cryptogamie
P.CORDIER	Pharmacie chimique
P.DUQUÉNOIS	Matière médicale et Hydrologie
P.JAEGER	Botanique
G.GAZET DU CHATELIER	Pharmacie galénique
M.HASSELMANN	Chimie analytique
J.SCHREIBER	Chimie organique
P.MÉTAIS	Chimie biologique
G.LAUSTRIAT	Physique et Mathématiques
J.C.STOCLET	Pharmacodynamie

Professeurs honoraires : MM. C.LAPP - J.P.EBEL.

Professeurs sans chaire :

MM. A.LEDOUX	Zoologie
J.MALGRAS	Hygiène

Maîtres de Conférences :

MM. C.F.LAPP	Sciences physico-chimiques
G.DIRHEIMER	Sciences appliquées
L.JUNG	Physique
C.MATHIS	Pharmacie galénique
A.STAHL	Biochimie pharmaceut. et technique

Maître de Conférences honoraire : M. E.COLLARD.

Cours complémentaire :

Mme. HUET-WEILLER	Législation et Déontologie pharmac.

Chefs de travaux pratiques :

Mme. M.KRISTENSEN-REH	Chimie
Mme. N.OURISSON-HEILIGENSTEIN	Physiologie végétale
M. C.ROMOND	Bactériologie
M. P.LAUGEL	Chimie
Mme. D.WENCKER-SCHAELDERLÉ	Physique et Mathématiques
M. C.G.WERMUTH	Chimie
Mlle M.MEYLAENDER	Essais de médicaments végétaux
M. G.STEINECKER	Pharmacie galénique et Zoologie
Mlle C.ASSENMACHER	Chimie
M. H.LAMI (délégué dans les fonctions)	Physique
M. J.P.SCHREIBER (- - - -)	Physique
M. Y.CHAMBRON (- - - -)	Chimie biologique
M. B.HORB (- - - -)	Parasitologie et Histologie

APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE FONCTIONNELLE SUR COUCHE MINCE AUX PRÉPARATIONS GALÉNIQUES A BASE D'ALCALOÏDES

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE.

A MA MÈRE.

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552712_0029

I N T R O D U C T I O N

L'origine de la chromatographie remonte aux travaux du botaniste polonais TSWETT qui, en 1906, sépara les différents pigments constituant la chlorophylle sur colonne d'alumine. Mais c'est seulement après la deuxième guerre mondiale que la chromatographie a pris un essor considérable et il existe à l'heure actuelle un ensemble de méthodes chromatographiques. Toutes ces méthodes ont pour but la séparation des constituants solides, liquides ou gazeux d'un mélange; le plus souvent,elles sont basées sur l'action antagoniste de deux phases : une phase dite stationnaire qui retient sélectivement les substances à séparer et une phase dite mobile qui au contraire tend à les entraîner sélectivement; on appelle élution l'entraînement des constituants par la phase mobile.

La chromatographie sur colonne fut la première technique chromatographique utilisée. Elle consiste en un passage d'un solvant (phase mobile) à travers un adsorbant (phase stationnaire) contenu dans un tube cylindrique en verre.

Lorsque l'on veut séparer ou identifier les substances contenues dans un mélange à de faibles concentrations, il est préférable de s'adresser à deux techniques chromatographiques plus récentes et présentant un intérêt tout particulier pour l'analyse qualitative des produits non volatils : la chromatographie sur papier et la chromatographie sur couche mince.

La chromatographie sur papier (CP), imaginée en 1944 par CONSDEN, GORDON et MARTIN (14), est le plus souvent une chromatographie de partage; en effet, la séparation des composants d'un mélange, repose sur la différence de leurs coefficients de partage entre les phases d'un système solvant formé :

- d'une phase stationnaire (solvant aqueux ou organique peu volatil) qui imprègne une feuille de papier chromatographique.

- d'une phase mobile, elle-même constituée par un ou plusieurs solvants organiques volatils, saturés par la phase stationnaire.

Cette technique, appliquée dans les domaines les plus variés, a permis de faire des progrès énormes dans l'analyse des médicaments.

La chromatographie sur couche mince (CCM) ou technique des chromatoplaques est plus récente que la chromatographie sur papier. Dans le cas général, il s'agit d'une chromatographie d'adsorption sur une plaque de verre portant une couche mince d'un

adsorbant; un système solvant constituant la phase mobile produit une élution sélective des composants d'un mélange. Si dans son principe la chromatographie sur couche mince est donc comparable à la chromatographie sur colonne par le choix des solvants et des adsorbants, dans son application, par contre, elle se rapproche de la chromatographie sur papier.

Tant en chromatographie sur papier qu'en chromatographie sur couche mince, une substance sera caractérisée par son R_F (voir première partie, chapitre I), valeur déterminée expérimentalement qui peut varier sous l'influence des nombreux facteurs de l'expérience.

C'est par suite du manque de spécificité du R_F chromatographique pour l'identification indiscutable d'un principe actif d'une préparation pharmaceutique que nous avons jugé utile de compléter sa caractérisation par la chromatographie fonctionnelle sur couche mince.

Grâce à cette méthode qui fait l'objet de notre travail, nous essayons d'augmenter les preuves de l'identité d'un alcaloïde ou des préparations galéniques qui en contiennent par des réactions chimiques effectuées sur les micro-quantités de substance habituellement utilisées en chromatographie sur couche mince.

Avant de présenter nos travaux, nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à Monsieur G.GAZET DU CHATELIER, Professeur de Pharmacie Galénique, qui a bien voulu nous accorder sa confiance en nous accueillant dans son service et qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Qu'il nous soit permis d'exprimer nos remerciements respectueux à Monsieur P.DUQUÉNOIS, Professeur de Matière Médicale, Doyen honoraire de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, pour l'intérêt qu'il a manifesté et les encouragements qu'il nous a prodigués tout au long de l'élaboration de nos recherches et pour avoir accepté de faire partie du jury de notre thèse.

Notre reconnaissance toute particulière va à Monsieur Cl. MATHIS, Maître de Conférences de Pharmacie Galénique, qui a été l'instigateur de ce travail et qui nous a guidé avec compétence et affabilité. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueux attachement et nos sentiments de profonde gratitude.

PREMIÈRE PARTIE

LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE ET SES APPLICATIONS AUX ALCALOÏDES

P L A N

Chapitre I : TRAVAUX ANTÉRIEURS ET PRINCIPE.

1) Historique de la chromatographie sur couche mince (CCM).
2) Principe de la chromatographie sur couche mince.
3) Avantages - Inconvénients.

Chapitre II : TRAVAUX PERSONNELS. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES UTILISÉES POUR LA CCM DES ALCALOÏDES.

1) Préparation des chromatoplaques.
2) Applications des échantillons sur les chromatoplaques.
3) Développement.
4) Révélation.
5) Mesure du R_F - Reproductibilité.

Chapitre I

TRAVAUX ANTÉRIEURS ET PRINCIPE

1) Historique de la chromatographie sur couche mince (CCM).

Déjà en 1938, ZECHMEISTER (134) entrevoyait la possibilité d'utiliser des "colonnes ouvertes", idée qui devait vite évoluer vers la mise au point de la chromatographie sur couche mince. La même année, ISMAILOV et SCHRAIBER (37) décrivent pour la première fois cette technique analytique. En 1949, MEINHARD et HALL (60) reprennent cette méthode en utilisant un nouveau liant, l'amidon, qui assure à la couche adsorbante une parfaite adhérence. Peu après (1951), KIRCHNER et coll. (42) appliquent l'adsorbant sur des bandes de verre étroites; ils donnent à ce procédé analytique le nom de "chromatostrips". En 1954, REITSEMA (94) préconise l'utilisation de "chromatoplates", plaques de verre plus larges permettant une migration parallèle de substances témoins.

En France, MOTTIER et POTTERAT (62, 63) procèdent à un fractionnement de colorants en appliquant de l'alumine à sec et par pression sur une plaque de verre. Les travaux plus récents utilisant la CCM s'étendent aux substances les plus variées : LEDERER (47) l'applique à la séparation des caroténoïdes et des diterpènes, tandis que DEMOLE (16, 17) contrôle ainsi les éluats de différents pigments. PARIS et coll. (74) étudient et identifient par CCM de nombreux constituants de drogues végétales.

C'est grâce à la mise au point d'un appareillage standardisé par STAHL (110, 113) que la méthode a pu entrer dans la pratique courante pour l'identification des composants d'un mélange.

2) Principe de la chromatographie sur couche mince.

La séparation des composants d'un mélange par chromatographie sur couche mince est basée sur la différence de leur vitesse de déplacement le long d'un support poreux (phase stationnaire) parcouru par un système solvant approprié (phase mobile).

La chromatographie sur couche mince peut relever de trois principaux mécanismes physico-chimiques : adsorption, partage entre deux phases et échange d'ions.

Dans l'ensemble de notre travail, nous aurons à faire à une chromatographie d'adsorption qui réalise le fractionnement en deux temps :

a) la phase d'adsorption qui consiste en une fixation différentielle des substances en solution sur un adsorbant. L'adsorbant est étalé en couche mince et régulière sur une plaque de verre, à laquelle on donne le nom de chromatoplaque, et il est soumis avant l'emploi, à une activation par la chaleur.

b) la phase d'élution qui produit, durant le développement du chromatogramme, une migration sélective des substances.

Notion de R_F :

En chromatographie sur couche mince toute substance est identifiée, dans des conditions expérimentales déterminées par son R_F :

$$R_F = \frac{\text{distance de migration de la substance}}{\text{distance de migration du solvant.}}$$

Le R_F peut être considéré comme une constante physique d'un corps au même titre qu'un point de fusion ou un pouvoir rotatoire, à condition de bien préciser les modalités expérimentales.

3) Avantages - Inconvénients.

Les nombreux avantages de la chromatographie en couche mince par rapport à la chromatographie sur papier, ont provoqué ces dernières années un essor considérable de cette méthode parmi les techniques d'analyses chromatographiques.

a) le temps d'élution est plus court que dans la chromatographie sur papier, ce qui augmente la rapidité de l'analyse.

b) l'utilisation de révélateurs énergiques (acide sulfurique concentré, acide chlorosulfonique, température élevée) ne détériore pas le chromatogramme contrairement à la chromatographie sur papier.

c) l'étalement des spots est inférieur à celui observé en chromatographie sur papier, ce qui a pour conséquence d'accroître la sélectivité et la sensibilité lors de la révélation, d'où la possibilité de réduire les prises d'essais.

d) si la séparation des substances hydrophiles se fait parfois mieux en chromatographie sur papier, par contre le fractionnement des substances lipophiles obtenu en chromatographie sur couche mince est toujours meilleur qu'en chromatographie sur papier.

Cependant la chromatographie sur couche mince présente quelques inconvénients :

a) Comme en chromatographie sur papier, il est difficile de reproduire les résultats par suite de l'intervention de divers facteurs expérimentaux (épaisseur plus ou moins régulière de l'adsorbant, degré d'activation, etc.).

b) L'archivage des chromatogrammes n'est pas aisé, bien que l'apparition des couches chromatographiques sur support souple en polyester et les plaques de verre prêtes à l'emploi semblent résoudre ce problème en grande partie.

c) La nécessité de préparer les chromatoplaques à l'avance et avec leur appareillage spécialisé: cet inconvénient aussi disparaît en grande partie avec l'apparition dans le commerce de plaques prêtes à l'emploi.

Chapitre II

TRAVAUX PERSONNELS :

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES UTILISÉES POUR LA CCM DES ALCALOÏDES

1) Préparation des chromatoplaques.

a) Appareillage :

Depuis les travaux de STAHL (110, 113), l'étalement mécanique de la couche adsorbante permet d'obtenir des plaques d'épaisseur uniforme, caractéristique importante pour la reproductibilité des valeurs de R_F. Toutes les plaques utilisées au cours de notre travail ont été préparées avec l'étaleur de la firme DESAGA à fente réglable qui permet d'obtenir une épaisseur d'adsorbant de 0,2 à 2 mm d'épaisseur.

b) Adsorbant :

Au cours de nos essais de séparation des alcaloïdes, aucun des adsorbants essayés (alumine, poudre de cellulose de diverses qualités) n'a donné de résultats meilleurs que le gel de silice. C'est pourquoi, dans l'ensemble de notre travail, nous avons utilisé le gel de silice G d'après STAHL (Kieselgel G Merck) dans les proportions de 25 g d'adsorbant pour 55 ml d'eau distillée; cette quantité est suffisante pour préparer 10 plaques de 10 cm x 20 cm et d'une épaisseur égale à 0,25 mm.

On triture au mortier le mélange adsorbant - eau jusqu'à disparition totale des grumeaux et des bulles d'air durant 1 minute environ.

c) Etalement :

On procède ensuite à l'étalement de la masse ainsi préparée sur les plaques de verre préalablement dégraissées à l'éther de pétrole.

L'ensemble de ces opérations, trituration et étalement, ne doit pas dépasser 4 minutes, temps nécessaire à la prise du liant minéral constitué dans le cas du gel de silice par 13 % de plâtre.

d) Activation des plaques :

On laisse sécher les plaques sur le support de l'étaleur pendant 30 minutes à l'air, temps durant lequel l'adsorbant se

prend en masse. Puis on dispose les plaques sur les plateaux de séchage CAMAG et on active les plaques par un chauffage de 1 heure à l'étuve à la température de 105°C. Pendant les 20 premières minutes, il est recommandé de laisser s'échapper la vapeur d'eau par un orifice de l'étuve qu'on bouche ensuite. On laisse refroidir et on conserve les plaques dans un exsiccateur à anhydride phosphorique. La conservation des plaques dans un dessiccateur contenant du gel bleu de silice ne nous a pas donné entière satisfaction, étant donné la déshydratation lente et incomplète de l'atmosphère dans la cuve, comparée à celle obtenue avec l'anhydride phosphorique.

2) Applications des échantillons sur les chromatoplaques.

En général, nous déposons environ 1 µl de solution alcoolique ou chloroformique à 1 % (p/v) de l'alcaloïde (= 10 µg d'alcaloïde) à l'aide d'une micropipette ou d'un fin capillaire, à 2 cm du bord inférieur de la plaque et à 2 cm d'intervalle. Dans le cas d'un volume plus important, on a soin d'obtenir de petits spots en séchant la plaque entre chaque dépôt.

Si le dépôt des substances demande un temps assez long, il est nécessaire de réactiver la chromatoplaque par un passage de 5 minutes à l'étuve.

3) Développement.

a) Solvants de développement :

Au cours de ce travail, nous avons cherché, dans la mesure du possible, à éviter de multiplier les systèmes solvants. Dans un but de standardisation nous avons toujours rapporté les résultats au système solvant préconisé par WALDI (127) (chloroforme - acétone - diéthylamine 5 - 4 - 1). Toutefois il a été nécessaire de mettre au point pour chaque groupe d'alcaloïdes un ou deux systèmes de développement spéciaux adaptés à la polarité des produits de transformation des alcaloïdes.

Tous les solvants sont au préalable redistillés et séchés sur sulfate de sodium anhydre.

b) Saturation de l'atmosphère de la cuve :

Les cuves que nous utilisons sont cylindriques (hauteur : 26 cm , diamètre : 12 cm) et fermées à la partie supérieure par une plaque de verre rodée. Le faible diamètre de l'ouverture par rapport au volume total de la cuve, évite une désaturation notable de la cuve lors de la mise en place des chromatoplaques.

Après déshydratation de l'air de la cuve par l'anhydride phosphorique pendant 12 heures en l'absence de solvant, nous procédons à la saturation de la cuve en vapeurs du solvant de développement pendant 3 heures à l'aide d'un papier filtre tapissant les parois de la cuve et plongeant dans le solvant. La sursaturation de l'atmosphère évite un effet marginal lors du développement et permet d'obtenir un front rectiligne. En opérant de cette manière, le développement est accéléré et les valeurs de R_F sont légèrement inférieures.

c) Développement :

On place les chromatoplaques dans la cuve de telle façon que la ligne de départ soit parallèle à la surface du solvant. Ordinairement, à la température de 20°C, une distance de migration du solvant de 10 cm s'est avérée suffisante pour obtenir des séparations nettes des alcaloïdes étudiés.

4) Révélation.

La chromatographie sur couche mince ne pose pas de problèmes de révélation particuliers. La révélation des plaques peut se faire soit par pulvérisation du réactif à l'aide d'air comprimé, soit par trempage. Cette deuxième technique qui peut entraîner un étalement du spot ne doit être appliquée que dans le cas d'une évaluation densitométrique des taches. Dans le cadre d'une étude systématique des préparations pharmaceutiques à base d'alcaloïdes, nous n'avons retenu que les trois révélateurs généraux qui se sont avérés les plus sensibles.

a) Réactif de Dragendorff :

Depuis sa mise au point en 1866 par DRAGENDORFF (19), ce réactif a été utilisé comme réactif de précipitation en vue de la caractérisation des alcaloïdes dans les solutions extractives végétales et toxicologiques. En 1950, MUNIER et MACHEBOEUF (66) ont préconisé une formule modifiée en vue de son application en chromatographie sur papier. Par la suite, plusieurs auteurs ont proposé pour la révélation chromatographique des formules dérivés de celle de MUNIER et MACHEBOEUF (99). Pour notre part, après essai des différentes formules proposées, nous avons opté pour la formule originale de MUNIER et MACHEBOEUF :

Solution A :	Sous-nitrate de bismuth	0,850 g
	Eau distillée	40 ml
	Acide acétique glacial	10 ml
Solution B :	Iodure de potassium	8 g
	Eau distillée	20 ml

Solution-mère : Mélanger les solutions A et B.

Solution diluée pour l'emploi :

Solution-mère	10 ml
Acide acétique	20 ml
Eau distillée	100 ml

Conservée en flacon coloré, la solution diluée peut être utilisée plusieurs semaines après sa préparation.

b) Réactif iodoplatinique :

Préconisé par SELMI (109) en 1874 comme réactif de précipitation, ce réactif a été adapté à la révélation chromatographique par pulvérisation par MUNIER et MACHEBOEUF (65) qui ont retenu la formule suivante :

Solution aqueuse de chlorure de platine à 10 %	1 ml
Solution aqueuse d'iodure de potassium à 4 %.	25 ml
Eau distillée q.s.p.	50 ml

Si la sensibilité de révélation des alcaloïdes est moindre par rapport au réactif de Dragendorff, l'iodoplatinate de potassium présente néanmoins l'avantage de fournir des colorations différentielles.

Remarque : Avant utilisation de ces deux réactifs, la diéthylamine qui entre dans la composition des principaux solvants de développement, doit être préalablement éliminée, soit par simple évaporation à l'air libre ou à l'étuve, soit par exposition des plaques aux vapeurs d'acide chlorhydrique.

c) Lumière ultra-violette :

De nombreux alcaloïdes sont fluorescents en lumière de Wood, (365 mμ). Ce mode de révélation présente plusieurs avantages : pour les alcaloïdes fluorescents, il offre une très grande sensibilité et permet, après observation de la fluorescence, de révéler la chromatoplaque dans un deuxième temps par un autre réactif; d'autre part, certaines transformations fonctionnelles sur les alcaloïdes aboutissent à la formation de dérivés ayant une fluorescence propre (acide cinnamique de la rescinnamine, produits d'oxydation des colubrines).

5) Mesure du R_F - Reproductibilité.

Tous les R_F que nous indiquons sont des valeurs moyennes résultant d'un minimum de dix mesures. Nous avons eu soin lors de ces mesures, de changer de solvant après trois migrations consécutives.

D E U X I È M E P A R T I E

LA CHROMATOGRAPHIE FONCTIONNELLE SUR COUCHE MINCE

P L A N

Chapitre I : TRAVAUX ANTÉRIEURS.

Chapitre II : PRINCIPE ET TECHNIQUE.

1) Définition et buts.
2) Technique générale de la CFCM.
   a) Réaction au point d'application d'une chromatoplaque.
   b) Réaction en tube capillaire.
3) CFCM et postulat de MARTIN.

Chapitre III : TRAVAUX PERSONNELS. PRINCIPALES TRANSFORMATIONS FONCTIONNELLES UTILISÉES.

1) Action de la chaleur.
2) Estérification - Réaction d'acétylation.
3) Saponification.
4) Réduction par le borohydrure de sodium.
5) Réactions d'oxydation.
   a) Réaction à l'acide p-nitroperbenzoïque.
   b) Action de l'acide chromique.
   c) Action de l'acide nitrique concentré.
   d) Action de l'acétate mercurique.
6) Formation de semicarbazones.

Conclusions.

Chapitre I

TRAVAUX ANTÉRIEURS

En 1953, MILLER et KIRCHNER (61) sont les premiers à procéder à des transformations fonctionnelles, en appliquant le réactif directement sur la substance déposée au point d'application de la chromatoplaque. Quelques années plus tard (1962-1963), divers auteurs améliorent la séparation de composés de structure voisine en agissant sur leurs doubles liaisons : CARGILL (11) différencie de nombreux stérols par action du brome au point d'application d'une chromatoplaque; AZARNOFF et TUCKER (2) réalisent une époxydation sélective de dérivés cholesténiques par l'acide m-chlorperbenzoïque en vue de les séparer de leurs dérivés dihydrogénés. KAUFMANN et coll. (40) réussissent l'hydrogénation catalytique de stéroïdes directement sur une chromatoplaque. LISBOA et coll. (48) utilisent le borohydrure de sodium pour réduire les fonctions cétoniques des stéroïdes par action directe sur la chromatoplaque.

Au cours de travaux sur des huiles essentielles, MATHIS et OURISSON (56, 57, 58, 59) reprennent la technique préconisée par MILLER et KIRCHNER et étendent ses possibilités d'application en réalisant certaines réactions dans le tube capillaire qui sert à déposer les substances sur la chromatoplaque. Ces auteurs identifient ainsi d'une façon précise des substances organiques, par comparaison avec des produits de référence. PESNELLE et coll. (77) utilisent la même méthode pour caractériser spécifiquement certains alcools.

Puis KLEIN et coll. (43) identifient par la formation d'époxydes, l'oxyde de linalol contenu dans les huiles essentielles de géranium et de rose. RUSIECKI et HENNEBERG (100) inhibent la brucine par action d'une solution saturée de bichromate de potassium lors de la détection de la strychnine en toxicologie. Lors de l'étude des dérivés de la phénothiazine, KOFOED et coll. (44) forment des sulfoxydes en utilisant cette technique.

RIESS (96) sépare certains acides organo-phosphoriques sous forme d'esters méthyliques obtenus par action directe sur la chromatoplaque d'une solution éthérée de diazométhane.

En 1967, WILK et coll. (131), identifient avec une plus grande spécificité certains composés aromatiques par l'intermédiaire de leurs dérivés d'oxydation (action des vapeurs d'iode, de brome ou encore du mélange (HNO_3 + N_2O_5).

Chapitre II

PRINCIPE ET TECHNIQUE

1) Définition et buts.

La chromatographie fonctionnelle sur couche mince (CFCM) consiste à modifier d'une façon spécifique la nature chimique d'une substance que l'on veut identifier, par action de réactifs appropriés, soit au point d'application de la chromatoplaque, soit, pour les réactions lentes en solution, dans un tube capillaire; dans ce dernier cas, les produits transformés sont ensuite déposés sur la chromatoplaque.

En pratique, la CFCM constitue une technique micro-analytique très simple dont l'intérêt s'étend à divers domaines intéressant la pharmacie :

a) D'abord, la CFCM permet de procéder à des essais préliminaires de réaction de chimie organique sur des microquantités de substances en utilisant les techniques appropriées. Les réactions lentes peuvent être réalisées en tube capillaire en faisant varier suivant les cas les conditions expérimentales (temps de réaction, concentration des réactifs). D'autre part en scellant le tube capillaire aux deux extrémités, on peut opérer à chaud à la température optimale de réaction. En déposant la totalité ou une partie du contenu du tube capillaire au point d'application d'une chromatoplaque, on peut ensuite suivre l'évolution de la réaction qualitativement et même quantitativement par une évaluation de l'importance des nouveaux spots formés.

b) En chimie analytique, la CFCM permet d'identifier, dans un mélange, une substance de nature chimique connue, par comparaison avec un témoin traité dans les mêmes conditions. Pour un produit de nature chimique inconnu, on peut mettre en évidence la présence de certaines fonctions (alcool, cétone, etc.) par des réactions spécifiques modifiant la polarité de la substance, car les changements de R_F traduisent une variation de la polarité d'une substance, donc l'évolution de la réaction chimique envisagée.

c) Pour le contrôle des préparations pharmaceutiques qui fait l'objet de notre travail, la CFCM s'est avérée particulièrement intéressante : la caractérisation par CCM de principes actifs de nature chimique voisine et en faible quantité est souvent douteuse, alors que, par la CFCM qui tient compte des groupements fonctionnels des produits à caractériser, l'identification se fait sans équivoque.

2) Technique générale de la CFCM.

Comme nous l'avons déjà précisé, deux modes opératoires sont à retenir :

a) Au point d'application d'une chromatoplaque :

Dès 1951, KIRCHNER et MILLER (42) avaient proposé cette technique, mais en tant que méthode de caractérisation fonctionnelle, elle n'a guère été mentionnée depuis.

On dépose au point d'application de la chromatoplaque une microgoutte de réactif, une microgoutte de solution de la substance à analyser, puis à nouveau une microgoutte de réactif. Lorsque ce dépôt est sec, on peut recommencer la même opération, afin d'obtenir un mélange plus intime et augmenter ainsi le rendement de la réaction. La température et le temps de contact des différentes substances sont fonction de la vitesse de réaction. Parallèlement sur la même plaque, on opère d'une façon identique sur la substance de référence. Après activation de la plaque à l'étuve et refroidissement dans un exsiccateur, on procède au développement suivant la technique habituelle. Si on a utilisé des réactifs volatils (par ex. chlorure d'acétyle, acide nitrique concentré) on aura soin de prolonger l'action de la chaleur à une température suffisante pour chasser l'excédent de réactif qui perturberait la migration en présence d'un solvant de polarité différente.

Cette première technique présente deux inconvénients notables :

I) Même en alternant le dépôt de la substance et du réactif, on ne peut éviter une élution centrifuge des produits déposés. Du fait de cette élution, le mélange réactif-produit à analyser se fait imparfaitement et la réaction est incomplète.

II) D'autre part on ne peut guère varier les conditions de la réaction; par exemple, dans le cas des réactions nécessitant un contact prolongé ou une élévation de la température, il est souhaitable d'utiliser la technique du tube capillaire.

b) Réaction en tube capillaire :

La deuxième technique que nous avons utilisée, est celle préconisée par MATHIS et OURISSON (58), ce mode opératoire permet d'éviter les inconvénients imputables à la technique précédente.

A l'aide de deux micropipettes, on prélève des volumes déterminés de la solution à analyser d'une part et de réactif d'autre part. On fait passer ensuite par capillarité la moitié de la

quantité de réactif dans un tube capillaire (diamètre interne du tube capillaire 0,2 mm - 0,5 mm), puis la solution à analyser et enfin le reste du réactif. On mélange aussi parfaitement que possible les différents liquides par des inclinaisons répétées du tube capillaire. On laisse en contact à froid ou à chaud durant le temps nécessaire à la réaction. Si on chauffe le tube capillaire, on scelle préalablement les deux extrémités à la flamme. En fin de réaction, on sectionne les extrémités du tube capillaire et on dépose le contenu de celui-ci au point d'application d'une chromatoplaque. Parallèlement on procède de la même façon sur une solution de la substance de référence, traitée par le réactif dans des conditions identiques. On effectue ensuite le développement de la manière habituelle. Si cette technique permet d'appliquer la CFCM aux réactions lentes et à celles nécessitant un chauffage, son utilisation est néanmoins limitée par les propriétés de solubilité des réactifs et des produits à analyser, et la miscibilité des différentes solutions.

3) CFCM et postulat de MARTIN.

Selon le postulat de MARTIN (29), le R_M d'une substance $\left[R_M = \log \left(\frac{1}{R_F} - 1\right)\right]$ est égal à la somme des R_M de ses groupements fonctionnels plus une constante pour le système solvant. En première analyse, on peut en déduire que deux substances qui ont des R_F identiques pour un solvant donné en chromatographie sur papier ou en CCM, formeront des dérivés ayant également les mêmes R_F. Les transformations fonctionnelles préconisées n'ajouteraient donc rien à la caractérisation ou à la séparation de certaines substances.

Or, si ce postulat a été maintes fois vérifié en chromatographie sur papier et en CCM, dans de nombreux cas, comme le démontrent nos travaux, les exemples ne manquent pas pour infirmer non pas théoriquement, mais pratiquement les conclusions précédentes. Ceci s'explique dans certains cas par le fait que par les transformations fonctionnelles on peut augmenter l'écart de la polarité entre deux substances de polarités très voisines à l'origine. Dans d'autres cas, les différences de réactivité de composés voisins vis-à-vis d'un même réactif contribuent également à l'intérêt de la CFCM malgré le postulat de MARTIN.

Les exemples qui suivent, en sont la preuve.

a) La différenciation des deux isomères α et β colubrines (méthoxystrychnines) constitue un exemple frappant : ces deux alcaloïdes à R_F toujours très voisins en CCM forment, après action de l'acide nitrique concentré, des dérivés quinoniques jaunes, dont les R_F sont nettement différents (voir page 89).

b) La caractérisation de l'atropine dans un mélange atropine-homatropine peut être délicate en CCM, alors qu'après action de la chaleur, l'atropine transformée en apoatropine se séparera très nettement de l'homatropine qui elle n'est pas touchée par la réaction de déshydratation interne (voir page 52).

Chapitre III

TRAVAUX PERSONNELS.
PRINCIPALES TRANSFORMATIONS FONCTIONNELLES UTILISÉES

1) Action de la chaleur.

L'action prolongée de la chaleur sur un alcaloïde peut entraîner une transformation chimique intéressante pour sa caractérisation.

Exemples :

a) La déshydratation de l'atropine en apoatropine et celle de la scopolamine en aposcopolamine par perte d'une molécule d'eau de l'acide tropique (voir page 52).

b) L'oxydation de la réserpine et de la rescinnamine (voir page 96).

Technique : Il suffit de soumettre à la température de 120°C pendant 1 heure une chromatoplaque sur laquelle on a déposé une quantité convenable (10 µg environ) d'alcaloïde au point d'application; puis on laisse refroidir la chromatoplaque dans un exsiccateur jusqu'au moment du développement.

2) Estérification - Réaction d'acétylation.

Les alcaloïdes qui présentent des groupements -OH alcooliques ou phénoliques, peuvent être caractérisés d'une façon spécifique par la formation de dérivés acétylés moins polaires, donc à R_F plus élevés dans les systèmes solvants habituels. Cette réaction présente l'avantage d'augmenter le poids moléculaire des produits de transformation et, par conséquent, la sensibilité de la révélation. En outre, suivant le nombre des groupements -OH présents, il se forme des dérivés mono-, di- ou triacétylés, ce qui augmente la certitude de caractérisation des alcaloïdes polyhydroxylés par l'apparition de différents dérivés d'acétylation.

Exemple : Acétylation des alcaloïdes de l'opium (voir page 74): la morphine (2 -OH) donne les dérivés mono- et diacétylés, la codéine (1 -OH) seulement le dérivé monoacétylé, la papavérine (pas de groupement-OH) ne réagit pas.

Remarque : Le chlorure d'acétyle agit, dans certains cas, comme déshydratant. C'est ainsi qu'il transforme l'atropine en apoatropine (voir page 52) et qu'il enlève une molécule d'eau à l'ajmaline (voir page 98).

Réactif : Chlorure d'acétyle pur ou
Anhydride acétique - pyridine 1-2 .

Technique : Parmi les agents d'acétylation essayés (anhydride acétique, chlorure d'acétyle, anhydride acétique + pyridine), le chlorure d'acétyle a donné les réactions les plus complètes. La réaction se fait soit directement au point d'application de la chromatoplaque (alcaloïdes de l'Opium, des Ipécas et des Lobélies), soit en tube capillaire pour les alcaloïdes moins sensibles (alcaloïdes des Rauwolfia, des Quinquinas).

Dans le cas d'une application directe du réactif sur la plaque, on augmente le rendement de la réaction par des dépôts successifs de chlorure d'acétyle durant 2 à 3 minutes.

Si on utilise la technique du tube capillaire, la réaction se fait à 100°C pendant 1 heure, en tube capillaire scellé avec la solution chloroformique d'alcaloïde.

Après le dépôt du réactif et en fin de réaction, il est nécessaire de volatiliser le réactif en excès par un chauffage de la chromatoplaque à 120°C pendant 10 minutes.

3) Saponification.

La saponification constitue, en CFCM, une transformation fonctionnelle indispensable à la caractérisation des esters par la mise en évidence des produits de déboublement sur chromatoplaque. Cette réaction présente l'inconvénient d'abaisser le poids moléculaire des produits analysés, et de diminuer ainsi la sensibilité de la réaction; il est donc nécessaire d'utiliser une prise d'essai plus importante.

Exemple : L'atropine en présence de potasse alcoolique se scinde en tropanol et en acide tropique (voir page 51).

D'autres alcaloïdes comme la cocaïne, la réserpine, la pilocarpine sont également dédoublés suivant le même processus.

Réactif : Solution normale de potasse alcoolique, obtenue en mélangeant :

10 ml de potasse aqueuse 10 N
90 ml d'alcool à 95°.

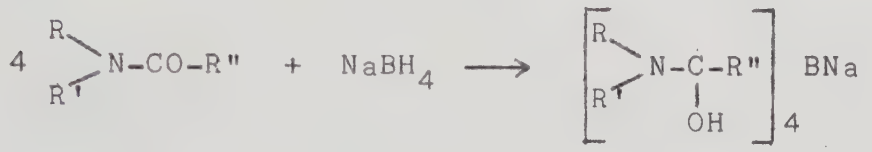
La potasse alcoolique présente, sur la potasse aqueuse, l'avantage de se mélanger aux solutions chloroformiques d'alcaloïdes.

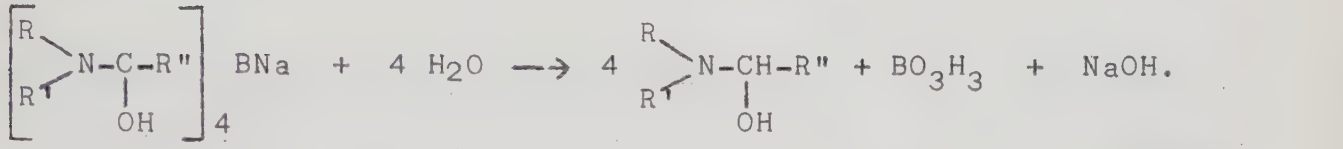
Technique : Pour obtenir un rendement satisfaisant, il est préférable d'opérer en tube capillaire. On mélange la solution d'alcaloïde à 1 % (p/v) avec le réactif, on scelle le tube capillaire à la flamme et on le maintient pendant 1 heure à 100°C.

4) Réduction par le borohydrure de sodium $NaBH_4$.

Le borohydrure de sodium possède la propriété de réduire les aldéhydes en alcools primaires, les cétones en alcools secondaires.

Le mécanisme de la réaction de réduction est le suivant :





C'est le réducteur qui s'est avéré le plus commode à utiliser en CFCM. Contrairement à l'hydrure d'aluminium et de lithium, il peut être utilisé en tube capillaire et il présente une plus grande spécificité de réaction.

Exemples :

a) La lobéline (1 -CO- et 1 -CHOH-) et la lobélanine (2 -CO-) sont réduites en lobélanidine (2 -CHOH-) (voir page 69).

b) Pour la strychnine, le borohydrure de sodium remplace avantageusement le mélange zinc + HCl dans la réaction de MALAQUIN-DENIGÈS, appliquée sur chromatoplaque (voir page 88).

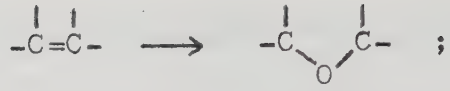
Réactif : Solution à 1 % (p/v) de $NaBH_4$ dans l'alcool absolu.

Technique : La réaction se fait directement sur la chromatoplaque en 10 minutes (strychnine) ou en tube capillaire à la température ordinaire en 1 heure (lobéline); le réactif en excès n'est pas gênant pour le développement de la chromatoplaque avec les systèmes solvants que nous avons utilisés.

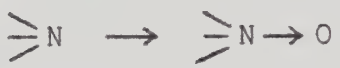
5) Réactions d'oxydation.

a) Réaction à l'acide p-nitroperbenzoïque $p\text{-}NO_2\text{-}C_6H_4\text{-}CO_3H$.

Ce réactif possède les mêmes propriétés chimiques que l'acide perbenzoïque, mais présente sur ce dernier l'avantage d'une stabilité bien meilleure. Il s'est avéré très intéressant en CFCM pour sa spécificité de réaction : avec les composés non saturés, il forme des époxydes :



avec les amines tertiaires, des aminoxydes :



Dans le cas des alcaloïdes, nous n'avons pas trouvé de cas de formation d'époxydes utilisables pour leur caractérisation en CFCM. Par contre, la formation spécifique d'aminoxydes avec certains alcaloïdes à azote tertiaire présente des applications intéressantes en CFCM.

Exemple : Les alcaloïdes du groupe de l'atropine et la spartéine, sont transformés en génalcaloïdes (voir page 53).

Remarque : D'autres alcaloïdes (aconitine, émétine, lobéline, pilocarpine) subissent des transformations avec un faible rendement, de nature indéterminée et inutilisable pour la CFCM.

Réactif : Solution éthérée (ou chloroformique) d'acide p-nitroperbenzoïque à 2 % (p/v).

Technique : La réaction se fait, après mélange du réactif avec la solution alcaloïdique, dans un tube capillaire scellé pendant 1 heure à 100°C ; l'excès de réactif ne gêne pas le développement de la chromatoplaque.

b) Action de l'acide chromique :

Cet oxydant énergique qui dégrade complètement certaines molécules d'alcaloïdes, agit par contre sur d'autres alcaloïdes en transformant respectivement leur fonction alcool primaire ou secondaire en fonction aldéhyde ou cétone.

Exemple : La lobélanidine (2 -CHOH-) sera oxydée en lobélanine (2 -CO-) (voir page 65).

Réactif : Solution d'acide chromique à 10 % (p/v) dans l'acide acétique glacial.

Technique : Du fait qu'il s'agit d'un oxydant énergique, la réaction se fait avec un bon rendement (supérieur à 50 %) au point d'application de la chromatoplaque. Après 20 minutes de contact, on chasse l'excès d'acide acétique par une exposition de la plaque à 100°C pendant 5 minutes, et on la laisse refroidir dans un exsiccateur avant développement.

c) Action de l'acide nitrique concentré :

L'acide nitrique est un réactif agissant soit comme acide, soit surtout comme oxydant. En général, son action trop énergique

manque de spécificité et le rend inutilisable en CFCM. Néanmoins, il s'est révélé très intéressant pour l'identification en CFCM des principaux alcaloïdes des Strychnos qu'il oxyde sélectivement (voir page 89).

Réactif : Acide nitrique concentré.

Technique : Sur l'alcaloïde au point d'application d'une chromatoplaque, on dépose une goutte d'acide nitrique concentré; après un contact de 15 minutes, on élimine l'excès de réactif par chauffage à 120°C pendant 15 minutes.

d) Action de l'acétate mercurique $(CH_3COO)_2Hg$:

L'acétate mercurique peut être utilisé en CFCM comme un oxydant doux. Il s'est montré particulièrement intéressant dans le cas des alcaloïdes des Ipécas, émétine et céphéline, qui sont oxydés sélectivement en formant des produits différemment colorés (voir page 82).

6) Formation de semicarbazones.

La présence de groupements carbonyle dans la structure de certains alcaloïdes permet une réaction de condensation de ces alcaloïdes avec le chlorhydrate de semicarbazide :

$$(H_2N\text{-}NH\text{-}CO\text{-}NH_2)\ HCl$$

$$\begin{matrix} R \\ \diagdown \\ \quad C{=}O \\ \diagup \\ R \end{matrix} + H_2N\text{-}NH\text{-}CO\text{-}NH_2 \xrightarrow{-H_2O} \begin{matrix} R \\ \diagdown \\ \quad C{=}N\text{-}NH\text{-}CO\text{-}NH_2 \\ \diagup \\ R \end{matrix}$$

Les semicarbazones ainsi formées ont une polarité supérieure à celle des alcaloïdes de départ, ce qui entraîne une diminution de la valeur des R_F.

Exemple : Formation des semicarbazones de lobéline (1 -CO-) et de lobélanine (2 -CO-) (voir page 64).

Réactif :

Chlorhydrate de semicarbazide	1 g
Acétate de sodium	1 g
Eau distillée	3 g

Technique : On laisse en contact pendant 1 heure à la température ordinaire dans un tube capillaire le réactif précédent avec une solution alcoolique des alcaloïdes envisagés; le réactif en excès ne gêne pas le développement ultérieur de la chromatoplaque.

Conclusions.

Dans le tableau suivant sont résumées les transformations fonctionnelles applicables aux principales fonctions organiques que nous avons mises au point au cours de notre travail sur les alcaloïdes.

Fonctions	Transformations fonctionnelles
Doubles liaisons	Epoxydation par l'acide p-nitroperbenzoïque.
Alcools et Phénols	Acétylation par le chlorure d'acétyle ou l'anhydride acétique.
Alcools primaires et secondaires	Acétylation pyridinée. Oxydation en aldéhydes ou cétones par l'anhydride chromique.
Alcools tertiaires	Déshydratation par l'acide sulfurique concentré.
Aldéhydes et cétones	Réduction en alcools primaires et secondaires par le borohydrure de sodium. Formation de semicarbazones et de 2,4-dinitrophénylhydrazones.
Esters et Amides	Saponification par la potasse alcoolique. Hydrolyse pour les esters très fragiles.
Amines tertiaires	Formation d'aminoxydes avec l'acide p-nitroperbenzoïque.

Remarque : Les transformations fonctionnelles qui se sont seulement avérées intéressantes pour un groupe donné d'alcaloïdes seront mentionnées dans les chapitres correspondants.

TROISIÈME PARTIE

EXTRACTION DES ALCALOÏDES A PARTIR DES PRÉPARATIONS GALÉNIQUES

P L A N

EXTRACTION DES ALCALOÏDES A PARTIR DES PRÉPARATIONS GALÉNIQUES

1) Solutés aqueux d'alcaloïdes purs.

2) Sirops.

3) Teintures.

4) Extraits.

5) Poudres végétales.

6) Comprimés et dragées.

7) Saccharures granulés.

8) Suppositoires et pommades.

EXTRACTION DES ALCALOÏDES A PARTIR DES PRÉPARATIONS GALÉNIQUES

L'extraction des alcaloïdes à partir d'une préparation galénique doit répondre à deux objectifs : d'une part éliminer les impuretés (saccharose, matières grasses, pigments) qui perturbent le développement chromatographique des alcaloïdes, d'autre part obtenir un soluté suffisamment concentré pour la chromatographie sur couche mince. Avant de procéder au prélèvement définitif d'un échantillon de la préparation galénique, on détermine préalablement la quantité à prélever en fonction de la sensibilité de révélation des alcaloïdes et de leur concentration dans la préparation.

Pour l'extraction, nous avons utilisé en premier lieu les méthodes classiques basées sur la solubilité des chlorhydrates d'alcaloïdes dans l'eau et celle des alcaloïdes bases dans les solvants organiques tels que l'éther ou le chloroforme. Pour certaines formes galéniques telles que les suppositoires, nous avons appliqué le plus souvent la technique préconisée par Mme ROUSSELET (99). En outre, pour les sirops et les saccharures granulés, nous avons employé une technique personnelle par chromatographie sur colonne qui sera détaillée dans la cinquième partie de notre travail.

1) Solutés aqueux d'alcaloïdes purs.

Si la concentration du soluté en alcaloïdes est insuffisante pour la CCM, on effectue une concentration de la solution au bain-marie, de façon à arriver à une concentration de l'ordre de 1 %.

2) Sirops.

On peut utiliser la méthode classique d'extraction des alcaloïdes par l'éther ou le chloroforme en milieu alcalin dans une ampoule à décantation. Cette méthode présente l'avantage d'être applicable pratiquement à tous les alcaloïdes, mais on peut noter plusieurs inconvénients : elle est longue, elle nécessite de grandes quantités de solvants et souvent les deux phases mises en présence dans l'ampoule à décantation forment une émulsion difficile à décanter. Dans la plupart des cas, la méthode que nous avons mise au point, évite en grande partie les inconvénients précédents. Elle consiste à incorporer le sirop à un adsorbant de chromatographie et à placer ce mélange dans une colonne, puis à éluer les alcaloïdes par des solvants appropriés. Cette technique sera développée ultérieurement dans la cinquième partie de notre exposé.

3) Teintures.

Elles sont purifiées par chromatographie sur colonne d'alumine. S'il s'agit d'une teinture contenant de la chlorophylle, on ajoute à l'adsorbant une faible quantité de charbon actif.

Technique : On utilise une colonne constituée par un tube de verre effilé à une extrémité, d'un diamètre intérieur de 5 mm et d'une longueur de 50 cm. La colonne est fermée à sa partie inférieure par un tampon de coton ou un filtre en verre fritté. On y introduit successivement un peu de sable de Fontainebleau lavé aux acides, l'adsorbant, et suivant les cas 1 à 5 ml de teinture. Puis on élue à l'aide d'une légère surpression d'air exercée au bout de la colonne, par de l'alcool de titre identique à celui de la teinture. L'éluat est concentré au bain-marie.

En présence d'une teinture contenant de la chlorophylle, on ajoute à l'adsorbant du charbon activé dans la proportion de 1 % (p/p).

4) Extraits.

Par dissolution de l'extrait dans l'alcool dilué, de titre convenable, on est ramené au cas de la teinture.

5) Poudres végétales.

On pourrait extraire les alcaloïdes par l'éther ou le chloroforme en milieu alcalin. Mais nous avons obtenu de meilleurs résultats en épuisant la poudre par de l'alcool de titre identique à celui de la teinture de la même drogue et en ramenant ainsi le problème à celui de la teinture.

6) Comprimés et dragées.

S'il s'agit de comprimés dragéifiés colorés, l'extraction des alcaloïdes est précédée de l'élimination de l'enrobage par de l'eau distillée.

Après pulvérisation des comprimés ou dragées, l'extraction des alcaloïdes est réalisable par l'éther ou le chloroforme en milieu alcalin. Pour un essai qualitatif rapide et si la teneur en alcaloïdes est suffisante, les comprimés pulvérisés peuvent être traités par l'alcool directement dans le tube qui sert à déposer l'alcaloïde sur la chromatoplaque.

7) Saccharures granulés.

L'extraction peut se faire en dissolvant le saccharure granulé dans l'eau et en extrayant les alcaloïdes par le chlorofor-

me en milieu alcalin. Une extraction par simple mélange des saccharures granulés avec de l'alumine et élution des alcaloïdes par un solvant approprié, tel que le chloroforme, nous a donné d'excellents résultats.

8) Suppositoires et pommades.

Si l'on a à faire à un excipient gras, insoluble dans l'eau, on dissout la prise d'essai dans de l'éther de pétrole; on obtient ainsi une solution que l'on épuise par de l'acide chlorhydrique dilué au 1/10 dans une ampoule à décantation. Puis on décante la phase aqueuse et on la lave à l'éther de pétrole pour éliminer toute trace d'excipient gras. Après alcalinisation de la phase aqueuse par l'ammoniaque au 1/10, on l'épuise par le chloroforme (10 ml) à deux reprises. Après évaporation de la solution chloroformique, on reprend le résidu par l'alcool à 90° et on procède aux transformations fonctionnelles.

Q U A T R I È M E P A R T I E

APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE FONCTIONNELLE SUR COUCHE MINCE AUX DIFFERENTS GROUPES D'ALCALOÏDES

P L A N

Chapitre I : ALCALOÏDES DU GROUPE DE L'ATROPINE.

A) Travaux antérieurs.

B) Travaux personnels.

1) Transformations fonctionnelles.

a) Saponification en tropanol et en scopolanol.
b) Déshydratation en apoalcaloïdes.
c) Transformation en génalcaloïdes.

2) Application des transformations fonctionnelles aux préparations pharmaceutiques.

Conclusions.

Chapitre II : ALCALOÏDES DU GROUPE DE LA LOBÉLINE.

A) Travaux antérieurs.

B) Travaux personnels.

1) Transformations fonctionnelles.

a) Formation de semicarbazones.
b) Acétylation.
c) Oxydation par l'anhydride chromique.
d) Réduction par le borohydrure de sodium.

2) Application des transformations fonctionnelles aux préparations pharmaceutiques.

Conclusions.

Chapitre III : ALCALOÏDES DE L'OPIUM ET DÉRIVES DE SYNTHÈSE.

A) Travaux antérieurs.

B) Travaux personnels.

1) Transformations fonctionnelles.

a) Acétylation.
b) Oxydation par l'acide p-nitroperbenzoïque.
c) Transformation particulière à la narcéine.

2) Application des transformations fonctionnelles aux préparations pharmaceutiques.

Conclusions.

Chapitre IV : ALCALOÏDES DES IPÉCAS.

A) Travaux antérieurs.

B) Travaux personnels.

1) Transformations fonctionnelles.

a) Oxydation par l'acétate mercurique.
b) Acétylation.

2) Application des transformations fonctionnelles aux préparations pharmaceutiques.

Conclusions.

Chapitre V : ALCALOÏDES DU GROUPE DE LA STRYCHNINE.

A) Travaux antérieurs.

B) Travaux personnels.

1) Transformations fonctionnelles.

a) Réduction par le borohydrure de sodium.
b) Oxydation par l'acide nitrique.

2) Application des transformations fonctionnelles aux préparations pharmaceutiques.

Conclusions.

Chapitre VI : ALCALOÏDES DES RAUWOLFIA.

A) Travaux antérieurs.

B) Travaux personnels.

1) Transformations fonctionnelles.

a) Oxydation de la réserpine et de la rescinnamine.
b) Saponification - Différenciation réserpine-rescinnamine.
c) Acétylation.

2) Application des transformations fonctionnelles aux préparations pharmaceutiques.

Conclusions.

Chapitre VII : CAFÉINE.

A) Travaux antérieurs.

B) Travaux personnels.

Chapitre I

ALCALOÏDES DU GROUPE DE L'ATROPINE

A - TRAVAUX ANTÉRIEURS.

Malgré les nombreux travaux réalisés en CCM pour les alcaloïdes de ce groupe, on n'a encore trouvé aucun moyen de séparer l'atropine racémique de l'hyoscyamine.

Dès 1960, TEICHERT et coll. (118, 119) ont obtenu la séparation des principaux alcaloïdes de la Belladone par CCM sur plaques de silice ou de cellulose avec divers systèmes solvants. En 1961, WALDI et coll. (127) donnent les R_F de l'atropine, de l'apoatropine, de la scopolamine et de l'homatropine dans 8 systèmes solvants. La même année, ROBLES et WIENTJES (98) effectuent déjà des essais de chromatographie préparative en vue d'isoler des quantités plus importantes d'alcaloïdes tropaniques. KHANNA et coll. (41) utilisent la CCM sur plaques d'alumine avec le mélange benzène-méthanol-diéthylamine 99-1-5 pour caractériser le tropanol et le pseudotropanol dans Withania somnifera.

En 1963, WEGH et coll. (130) appliquent la réaction de Vitali sur plaque pour détecter l'atropine en présence de papavérine. BÖHME et coll. (7) utilisent la CCM pour vérifier la pureté du sulfate d'atropine. KAISER et coll. (38) effectuent des essais en CCM sur des comprimés de sulfate d'atropine, afin de détecter la présence éventuelle de dérivés de cet alcaloïde. LIST et coll. (49) se servent également de la CCM pour contrôler des préparations galéniques végétales de Solanacées. GROSS et SCHUTTE (30) opèrent sur plaques de kieselgel G avec le mélange benzène-méthanol 4-1 pour séparer atropine et scopolamine; puis, après révélation au réactif de Dragendorff, ils évaluent la quantité d'alcaloïdes par planimétrie ou densitométrie des spots.

Dès 1964, STAHL (112) montre l'intérêt de la CCM sur couche d'adsorbant en gradient avec l'exemple de la séparation des alcaloïdes tropaniques.

Egalement en 1964, OSWALD et FLUCK (71, 72) différencient les alcaloïdes secondaires de la Belladone, sur plaques de silice avec le mélange méthyléthylcétone-méthanol-ammoniaque 7,5 % 6-3-1. VÁGUJFALVI (123) également fait une étude systématique de douze alcaloïdes tropaniques. NEUMANN et SCHRÖTER (69) séparent le tropanol et quelques composés voisins sur plaques de silice avec le mélange éthanol-ammoniaque 25 % 4-1. FROHNE (24) met en évidence, à l'aide de la CCM, la falsification d'une racine de Scrofulaire par des racines de Solanacées contenant de l'atropine. IKRAM et BAKSCH (35) développent les alcaloïdes du

groupe de l'atropine avec le méthanol, les éluent à partir des plaques à l'aide de chloroforme et les dosent par acidimétrie. SCHNECKENBURGER et HARTIKAINEN (106) appliquent la CCM quantitative au dosage des alcaloïdes dans Folia Belladonnae.

A partir de 1964, certains auteurs proposent des méthodes standardisées pour la caractérisation par CCM des alcaloïdes du groupe de l'atropine. Dans une proposition pour le D.A.B.7 (septième édition de la Pharmacopée allemande),LUCKNER et coll. (51), puis POETHKE et HOFFMANN (81, 82) reprennent les travaux antérieurs et retiennent le gel de silice comme adsorbant et le système solvant I de WALDI (chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1). WARTMANN-HAFNER (128) préconise des méthodes d'identification par CCM de l'atropine et de la scopolamine dans les extraits de Belladone et de Jusquiame, en utilisant le solvant préconisé par OSWALD et FLUCK.

En 1965, BÜCHI et ZIMMERMANN (9) proposent le développement sur plaques de kieselgel G avec le mélange acétone-ammoniaque diluée 95-5 en vue du dosage des alcaloïdes par planimétrie des spots révélés au réactif de Dragendorff. ZIELINSKA-SOWICKA et WOJCIK (135) évaluent également l'atropine et la scopolamine quantitativement après développement avec le mélange acétone-chloroforme-méthanol-ammoniaque 25 % 20-20-3-1.

Très récemment, ADAMSKI et coll. (1) identifient les alcaloïdes tropaniques dans les solutés injectables par CCM sur plaques de kieselgel G, préparées avec une solution de potasse, avec le système solvant éthanol 80 % - ammoniaque 25 % 97-3. RIEHL et REICH (95) utilisent également la CCM pour mettre en évidence les modifications chimiques des solutions aqueuses d'atropine.

B - TRAVAUX PERSONNELS.

Les alcaloïdes-esters dérivant du tropane, atropine, hyoscyamine et scopolamine, constituent les principes actifs de diverses Solanacées, qui de nos jours sont souvent utilisées sous forme galénique (teinture, extrait).

Nous avons mis au point trois transformations chimiques bien connues : saponification en tropanol et scopolanol, déshydratation en apoalcaloïdes, formation de génalcaloïdes, dont l'application a été étendue aux diverses préparations galéniques de Solanacées.

1) TRANSFORMATIONS FONCTIONNELLES.

a) Saponification en tropanol et en scopolanol :

Les alcaloïdes du groupe de l'atropine sont des esters dédoublables en milieu alcalin avec formation d'une base dérivée du tropane (46) :

atropine ⟶ tropanol + acide d-ℓ tropique
hyoscyamine ⟶ tropanol + acide ℓ- tropique
homatropine ⟶ tropanol + acide phénylglycolique
scopolamine ⟶ scopanol + acide ℓ- tropique.

Le scopanol (= scopine), instable, est immédiatement isomérisé en scopolanol (= scopoline).

En CFCM nous n'avons pu réaliser la saponification en déposant l'alcaloïde au point d'application d'une chromatoplaque avec la potasse alcoolique; en effet, il se produit en priorité la déshydratation en apoalcaloïdes (voir ci-dessous), comme l'ont signalé VINCENT et coll. (125). Par contre, nous n'avons pu effectuer la saponification aisément par contact de l'alcaloïde et de la potasse alcoolique en tube capillaire scellé. Après dépôt du contenu du tube capillaire au point d'application, la chromatoplaque est développée dans le solvant chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1 et révélée au réactif de Dragendorff (voir technique) : à la place des spots orangés de l'atropine, de l'homatropine ou de la scopolamine, sont apparus les spots violacés du tropanol ou du scopolanol (voir tableau I).

Spécificité :

La réaction de saponification est spécifique des alcaloïdes-esters (atropine, scopolamine, cocaïne, aconitine, réserpine), bien que d'autres alcaloïdes (pilocarpine, quinine, ésérine) soient modifiés. Mais parmi tous les alcaloïdes étudiés, seuls les alcaloïdes du groupe de l'atropine laissent apparaître un spot violacé au réactif de Dragendorff et de R_F inférieur après action de la potasse alcoolique.

Sensibilité :

La réaction est relativement peu sensible (environ 30 µg) pour deux raisons : la saponification dédouble les alcaloïdes, donc diminue le poids moléculaire; la révélation des produits de dédoublement (tropanol et scopolanol) est beaucoup moins sensible (20 µg pour obtenir un spot suffisamment net).

Technique :

Dans un tube capillaire, on mélange 1 goutte de solution alcaloïdique à 1 % avec quelques gouttes d'une solution normale de potasse dans l'alcool à 95°. On scelle le tube capillaire à la flamme et on le maintient à 100°C pendant 60 minutes. Le contenu du tube capillaire est ensuite appliqué au point d'application d'une chromatoplaque et le développement est effectué dans le solvant I (voir figure 3).

b) Déshydratation en apoalcaloïdes :

Sous l'influence de la chaleur ou de divers réactifs (anhydride acétique, acide nitrique concentré, potasse, etc.), l'acide tropique perd une molécule d'eau avec formation d'acide apoatropique (voir figure 2). Dans ces conditions, les alcaloïdes contenant l'acide tropique (atropine, scopolamine) sont transformés en apoalcaloïdes (apoatropine, aposcopolamine). L'homatropine, dérivée de l'acide phénylglycolique C_6H_5-CHOH-COOH, reste intacte.

La déshydratation en apoalcaloïdes est facilement réalisée sur l'alcaloïde déposé au point d'application d'une chromatoplaque, qui est ensuite développée dans le solvant I et révélée. Au-dessus des spots de l'atropine et de la scopolamine, sont apparus les spots plus intenses de l'apoatropine et de l'aposcopolamine (voir tableau I et figure 3).

Remarque : La déshydratation de l'atropine par la chaleur fait apparaître au point d'application un deuxième spot, dû à la belladonine qui provient de la dimérisation de l'apoatropine. La belladonine a été identifiée par comparaison avec la bellacristine (bisulfate de belladonine) Merck, à l'aide de différents solvants dont le mélange méthyléthylcétone-méthanol-ammoniaque 7,5 % 6-3-1, préconisé par OSWALD et FLUCK (72).

Spécificité :

Avec la technique utilisée, la transformation fonctionnelle est spécifique de l'atropine et de la scopolamine; c'est la seule des trois transformations à permettre la distinction atropine-homatropine.

Sensibilité :

La transformation en apoalcaloïdes est très sensible (environ 5 µg) et constitue la meilleure transformation fonctionnelle de l'atropine et de la scopolamine.

Technique :

Au point d'application de la chromatoplaque, on dépose 1 µl de solution alcaloïdique à 1 % et on chauffe la plaque à 120°C pendant 60 minutes ou on dépose à plusieurs reprises une goutte d'anhydride acétique sur le spot de l'alcaloïde et on laisse en contact à froid pendant 60 minutes. Le développement se fait ensuite dans le solvant I.

c) Transformation en génalcaloïdes :

Même prolongée en tube capillaire, l'action de l'eau oxygénée concentrée, réactif cité dans la littérature (46), ne donne les génalcaloïdes qu'avec un faible rendement. Nous avons pu améliorer le rendement et rendre la réaction applicable en CFCM en utilisant comme oxydant l'acide p-nitroperbenzoïque en solution éthérée. Comme les génalcaloïdes restent au point d'application avec le solvant I, nous avons effectué le développement avec le solvant chloroforme-méthanol-diéthylamine 9-1-0,5, préconisé par PARIS et coll. (74).

Dans les conditions décrites (voir technique), le rendement de la transformation en génatropine, génoscopolamine et génohomatropine est d'environ 50 %. En faisant agir l'acide p-nitroperbenzoïque sur l'atropine, on observe, au-dessus du spot de la génatropine, un deuxième spot dû au génotropanol; ce deuxième spot a été identifié par comparaison avec le génotropanol, formé par action de l'acide p-nitroperbenzoïque sur le tropanol. Avec l'homatropine, il apparaît plusieurs spots dont ceux de la génohomatropine et du génotropanol.

Spécificité :

Avec la technique utilisée, seuls l'ésérine et les alcaloïdes du groupe de l'atropine conduisent à un génalcaloïde; cependant divers alcaloïdes, en particulier ceux du groupe de la quinine, forment des époxydes par fixation d'oxygène sur leurs doubles liaisons. Cette transformation fonctionnelle n'est donc spécifique que par les R_F des génalcaloïdes dans les solvants I et II (voir tableau I).

Sensibilité :

Comme la transformation en génalcaloïdes se fait avec un bon rendement et sans diminuer la sensibilité de la réaction, elle est applicable à partir de 10 µg d'alcaloïde.

Technique :

On opère comme pour la saponification, mais le réactif est une solution éthérée d'acide p-nitroperbenzoïque à 2 % et le développement se fait dans le solvant II.

Tableau I

Couleurs de révélation et valeurs de R_F des alcaloïdes du groupe de l'atropine

Alcaloïde	Couleurs de révélation		R_F	
	Réactif de Dragendorff	Réactif iodoplatinique	Solvant I	Solvant II
Atropine-hyoscyamine	orangée	bleu violacé	0,37 (0,38)	0,58
Scopolamine	orangée	bleu violacé	0,54 (0,56)	0,74
Homatropine	orangée	bleu violacé	0,36 (0,37)	
Apoatropine	orangée	bleu violacé	0,52 (0,54)	0,72
Aposcopolamine	orangée	bleu violacé	0,70	0,90
Tropanol	rose violacé	gris bleu	0,20	0,26
Scopolanol	rose violacé	gris bleu	0,58 (0,60)	0,79
Génatropine	orangée	rose violacé	0,00 (0,00)	0,19 (0,20)
Génoscopolamine	orangée	bleu violacé	0,00 (0,00)	0,03
Génohomatropine	orangée	bleu violacé	0,00	

Les valeurs de R_F indiquées constituent une moyenne de nos mesures et sont données avec une marge d'erreur de $\pm$ 0,02.

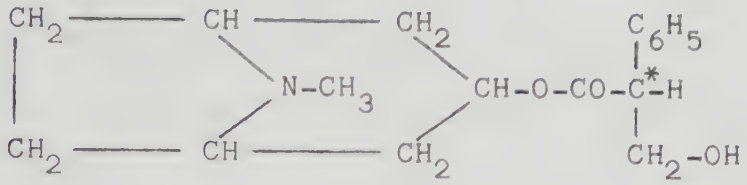
Entre parenthèses, figurent les R_F trouvés par PARIS et coll. (74) pour les génalcaloïdes, par WALDI et coll. (127) pour les autres alcaloïdes.

Solvant I : chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1.

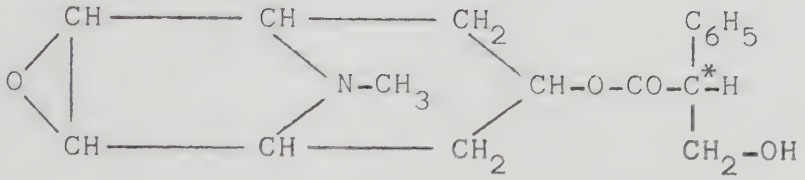
Solvant II : chloroforme-méthanol-diéthylamine 9-1-0,5.

Figure 1 - Formules des alcaloïdes du groupe de l'atropine.

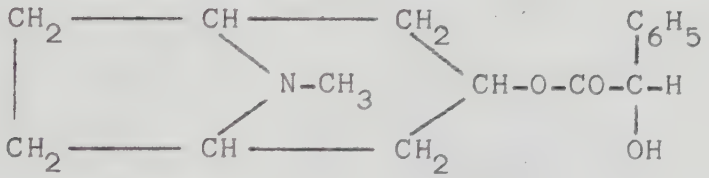
ATROPINE



SCOPOLAMINE



HOMATROPINE



BELLADONINE (formule selon l'Index Merck, Darmstadt, 9e éd., 1961).

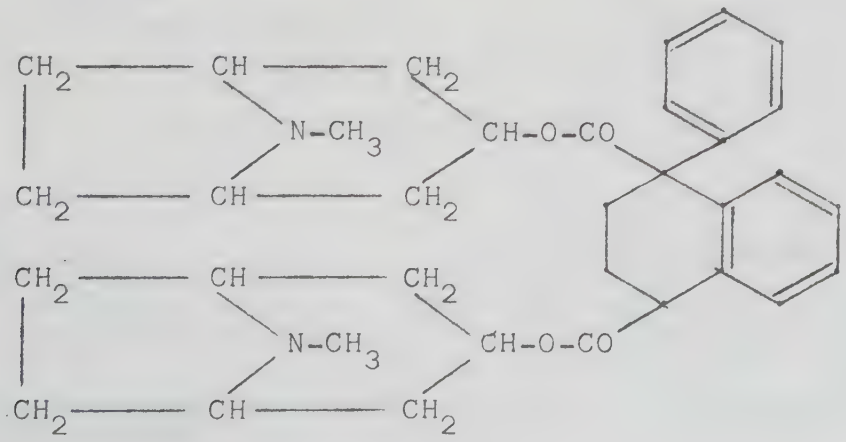


Figure 2 - Transformations fonctionnelles de l'atropine.

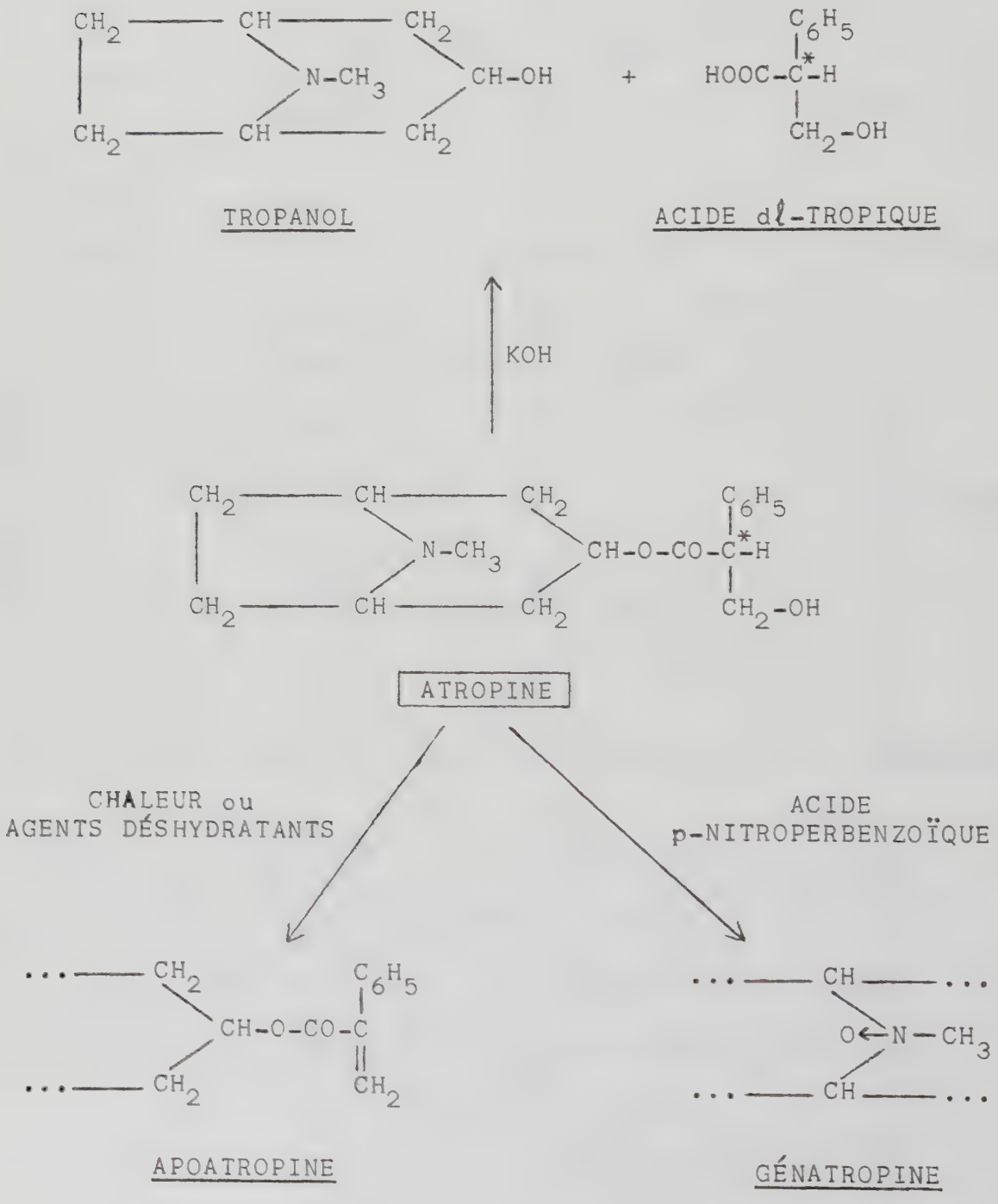
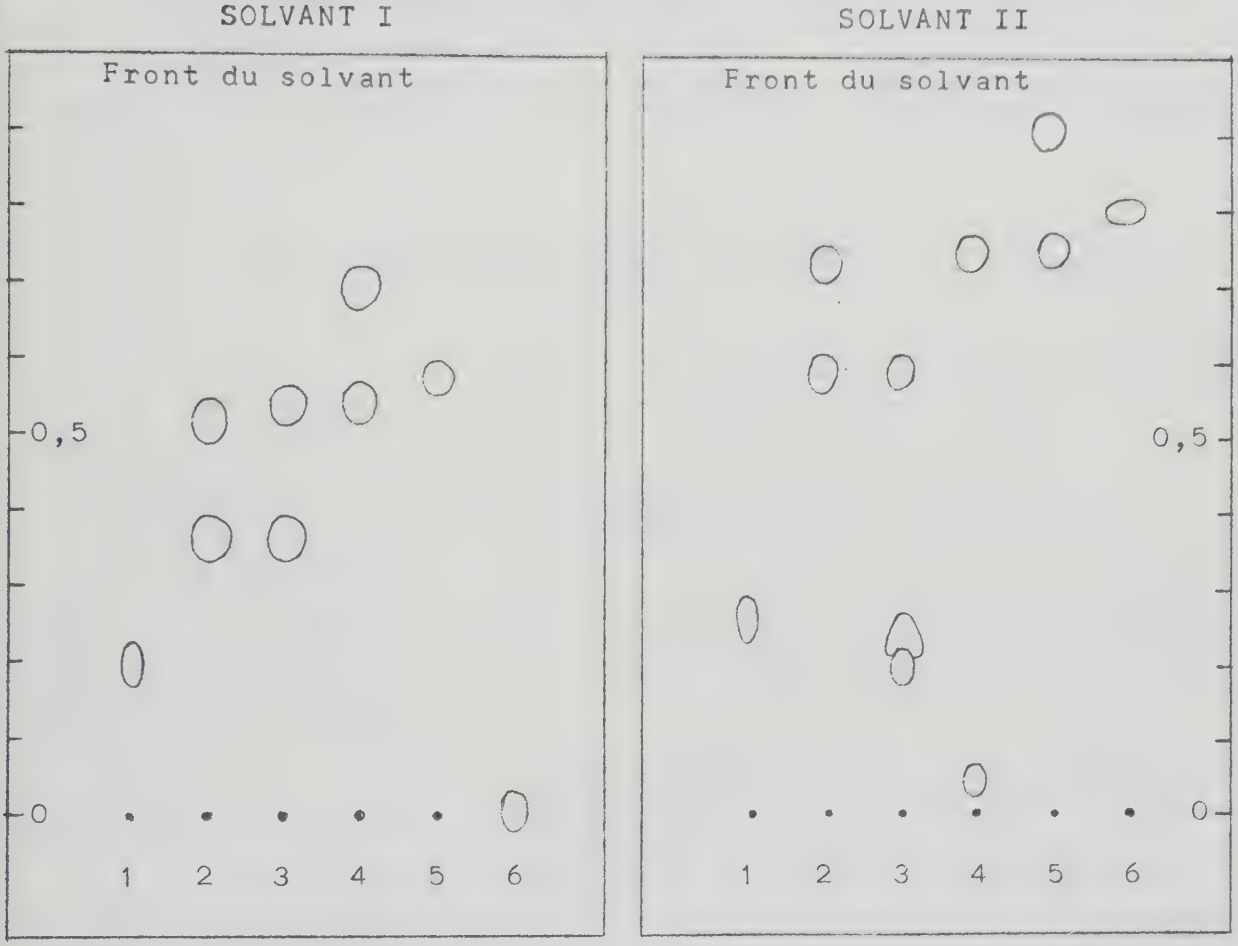


Figure 3 - Transformations fonctionnelles de l'atropine et de la scopolamine.



Adsorbant : kieselgel G.

Solvant I : chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1.

Solvant II : chloroforme-méthanol-diéthylamine 9-1-0,5.

Lire de bas en haut :

1. Tropanol.
2. Atropine-apoatropine.
3. Atropine-scopolamine.
4. Scopolamine-aposcopolamine.
5. Scopolanol.
6. Génatropine-génoscopolamine.

1. Tropanol.
2. Atropine-apoatropine.
3. Génatropine-génotropanol-atropine.
4. Génoscopolamine-scopolamine.
5. Scopolamine-aposcopolamine.
6. Scopolanol.

2) APPLICATION DES TRANSFORMATIONS FONCTIONNELLES AUX PRÉPARATIONS PHARMACEUTIQUES.

Suivant la concentration en alcaloïdes tropaniques, une ou plusieurs modifications fonctionnelles peuvent être utilisées pour leur caractérisation dans les préparations pharmaceutiques; ces dernières contiennent soit les alcaloïdes purs, soit des préparations galéniques de Belladone, de Jusquiame ou de Datura.

Tableau II

Teneur en alcaloïdes des préparations galéniques de Belladone, de Jusquiame et de Datura

	Alcaloïdes totaux % Codex de 1965 (sauf teinture de Datura)			Rapport atropine + hyoscyamine/scopolamine
	Feuille	Teinture	Extrait	
Belladone	0,30-0,50	0,03	2,5	supérieur à 20
Jusquiame	0,05-0,10	0,01	0,4	1 à 5
Datura	0,25	0,03	-	1 à 5

a) Solutés aqueux d'alcaloïdes purs :

Les transformations fonctionnelles sont réalisées comme pour les solutions d'alcaloïdes de référence.

Technique :

(solutés injectables de sulfate d'atropine et de bromhydrate de scopolamine à 0,05 g/ml, soluté de bromhydrate d'homatropine). Les transformations fonctionnelles sont effectuées directement sur les solutés ou mieux, après concentration au 1/10.

b) Granules d'alcaloïdes purs :

Les trois transformations fonctionnelles sont facilement applicables sur l'extrait éthanolique d'un granule. La transformation en apoalcaloïdes est même réalisable sur la poudre du granule, déposée au point d'application de la chromatoplaque et imprégnée d'alcool.

Technique :

(atropine base, bromhydrate de scopolamine : 1 mg/granule). 1 granule est épuisé par 1 ml d'alcool à 95°; après concentra-

tion, la solution alcoolique est déposée directement sur les chromatoplaques pour la déshydratation, elle est introduite dans un tube capillaire pour les 2 autres réactions.

c) Comprimés à base d'alcaloïdes totaux de la Belladone :

La CFCM est applicable uniquement à l'atropine sur le résidu de l'éluat éthanolique des comprimés. Si un barbiturique est associé aux alcaloïdes, il est nécessaire d'extraire ces derniers par le chloroforme en milieu alcalin.

Technique :

Comprimés à 1/4 de mg d'alcaloïdes totaux par comprimé : on opère sur l'éluat alcoolique après concentration. Comprimés à 1/4 de mg d'alcaloïdes totaux + 0,05 g de phénobarbital par comprimé : on pulvérise 4 comprimés, on ajoute 1 ml de soude diluée et 10 ml d'eau, puis on extrait par le chloroforme; on évapore la solution chloroformique et on reprend le résidu par quelques gouttes d'alcool à 95°.

d) Teintures de feuilles de Belladone, de Jusquiame et de Datura :

Pour éliminer la chlorophylle gênante, nous soumettons la teinture à une chromatographie sur une microcolonne d'alumine contenant un peu de charbon activé. (En opérant avec l'alumine sans charbon selon la Pharmacopée belge V (1962) pour la poudre de Jusquiame, nous avons obtenu une élimination moins bonne des pigments). La colonne est ensuite éluée successivement par l'alcool à 95° et l'éther. Les transformations fonctionnelles sont réalisées sur le résidu d'évaporation de l'éluat éthéro-alcoolique.

Par cette méthode, l'atropine peut être caractérisée dans 1 ml de teinture par ses trois transformations fonctionnelles. Par contre, la scopolamine ne peut être mise en évidence que sur 5 ml de teinture de Jusquiame ou de Datura et uniquement par sa transformation en aposcopolamine (voir tableau II).

Technique :

Colonne : tube de verre (diamètre intérieur : 5 mm ; longueur: 50 cm) effilé à une extrémité. Adsorbant : 3 g d'alumine Merck (selon BROCKMANN), additionnés de 20 mg de charbon activé.

L'adsorbant, imprégné d'alcool à 95°, est tassé régulièrement dans la colonne. A la pression ordinaire, le liquide ne s'écoule pas. Sur la colonne, on verse 1 à 5 ml de teinture et on élue par 10 ml d'alcool, puis 10 ml d'éther; on recueille un éluat éthéro-alcoolique de 20 ml par chromatographie sous légère pression d'azote, appliquée au haut de la colonne. Après concentration, cet éluat à peine jaunâtre sert à la CFCM.

e) Poudre de feuilles de Belladone :

On pourrait extraire les alcaloïdes par l'éther en milieu alcalin. Nous avons obtenu de meilleurs résultats en épuisant la poudre à l'alcool et en ramenant ainsi le problème à celui de la teinture.

Technique :

0,5 g de poudre de feuilles sont introduits au haut de la colonne contenant l'adsorbant (voir teinture). La poudre est imbibée d'alcool à 95° qui est retenu par capillarité et elle est mise à macérer pendant 6 heures au moins. Puis on applique une légère surpression à la colonne jusqu'à écoulement de 10 ml d'alcool; on élue ensuite par 10 ml d'éther et on termine comme pour la teinture.

f) Préparations à base d'extraits de Belladone ou de Jusquiame :

Le problème est différent suivant la concentration des préparations en extrait, donc en alcaloïdes totaux; les préparations riches en extrait (par ex. la pommade belladonée à 10 % d'extrait) permettent de caractériser l'atropine par ses trois transformations fonctionnelles, la scopolamine par sa transformation en aposcopolamine. Sur les préparations pauvres en extrait (par ex. comprimés à 3 mg d'extrait de Jusquiame), seule la transformation de l'atropine en apoatropine est applicable.

Technique :

D'après (99) : 1 g de pommade (= 2,5 mg d'alcaloïdes totaux) est dissous dans 10 ml d'éther de pétrole; la solution est épuisée par 10 ml de ClH dilué. Décanter la phase aqueuse et la laver à l'éther de pétrole. Alcaliniser la phase aqueuse par l'ammoniaque diluée et extraire les alcaloïdes par le chloroforme. Evaporer à sec la solution chloroformique et reprendre le résidu par 0,2 ml d'alcool à 95°. La CFCM est effectuée sur la solution alcoolique.

5 à 10 comprimés à 3 mg d'extrait de Jusquiame (équivalent à 30 µg d'alcaloïdes totaux) sont pulvérisés, introduits dans un tube effilé comme un adsorbant de chromatographie sur colonne et épuisée par environ 10 ml d'alcool à 95°. Le soluté alcoolique est concentré jusqu'à quelques gouttes et utilisé pour la CFCM.

Conclusions.

Pour l'ensemble des préparations pharmaceutiques à base d'alcaloïdes tropaniques, on a toujours réussi à caractériser l'atropine par ses trois transformations fonctionnelles. La concentra-

tion en scopolamine étant plus réduite (voir tableau II) dans la plupart des cas, seule la transformation en aposcopolamine a pu être réalisée. Ceci ne présente pas un inconvénient majeur, étant donné que la caractérisation de l'atropine par CPCM permet de déceler avec certitude la présence ou l'absence de préparations galéniques de Solanacées dans des produits pharmaceutiques spécialisés plus complexes.

Chapitre II

ALCALOÏDES DU GROUPE DE LA LOBÉLINE

A - TRAVAUX ANTÉRIEURS.

En 1961, TEICHERT et coll. (119) séparent aisément lobéline, lobélanine et lobélanidine sur poudre de cellulose imprégnée de formamide avec le mélange benzène-heptane-diéthylamine 10-60-0,2. La même année, TSCHESCHE et coll. (120) utilisent le solvant chloroforme-éthanol 95-5 lors de la CCM préparative de Lobelia syphilitica sur plaques d'alumine préparées avec HCl 0,2 N.

Quelques années plus tard, BORIO et MOREIRA (8) obtiennent un fractionnement satisfaisant des alcaloïdes de Lobelia inflata sur gel de silice G avec le mélange cyclohexane-chloroforme-diéthylamine 50-40-5, alors que SCHWARZ et coll.(108) emploient comme adsorbant l'alumine sans liant.

En étudiant la stabilité des préparations de lobéline par CCM sur plaques de silice G, avec le mélange benzène-chloroforme 50-50 saturé par l'ammoniaque, PARRAK et coll. (75) détectent dix spots alcaloïdiques.

En 1966, VINCENT et coll. (126) obtiennent la séparation des alcaloïdes de la Lobélie enflée, sur la drogue sèche et la teinture en utilisant le système butanol-acide acétique-eau 4-1-5 et la silice fluorescente GF 254 comme adsorbant.

B - TRAVAUX PERSONNELS.

Dans ce groupe, notre étude a porté sur trois alcaloïdes, tous présents dans Lobelia inflata : lobéline, lobélanine et lobélanidine. Ces alcaloïdes ne diffèrent entre eux que par leurs groupements carbonyle et alcool secondaire :

lobélanine : 2 -CO-
lobéline : 1 -CO- , 1 -CHOH-
lobélanidine : 2 -CHOH-

C'est pourquoi nous utilisons pour leur différenciation par transformation fonctionnelle, un réactif de la fonction cétone (semicarbazide) et un réactif de la fonction alcool (chlorure d'acétyle).

1) TRANSFORMATIONS FONCTIONNELLES.

a) Formation de semicarbazones :

La présence de groupements cétoniques chez la lobéline et la lobélanine permet une réaction de condensation de ces alcaloïdes avec le chlorhydrate de semicarbazide :

lobélanine (2 -CO-) ⟶ mono- et disemicarbazones
lobéline (1 -CO-) ⟶ monosemicarbazone

Ces semicarbazones ont des R_F inférieurs à ceux des alcaloïdes de départ par suite de leur polarité plus grande.

Technique :

Sur une solution alcoolique des alcaloïdes envisagés, on fait réagir, durant 1 heure à la température ordinaire et en tube capillaire, une solution aqueuse de chlorhydrate de semicarbazide en présence d'acétate de sodium (chlorhydrate de semicarbazide 1 g - acétate de sodium 1 g - eau 3 g). Après dépôt des substances et réactivation de la chromatoplaque à 110°C pendant 5 minutes, on développe celle-ci dans le solvant IV ou le solvant V (voir figure 5 et tableau III).

Sensibilité :

Le rendement de la réaction étant de l'ordre de 60 %, cette condensation se fait aisément sur 10 µg d'alcaloïde.

Spécificité :

Parmi les alcaloïdes étudiés, seule la narcéine réagit positivement en présence de ce réactif.

b) Acétylation :

Cette réaction aussi mentionnée pour les alcaloïdes de l'opium, des Rauwolfia et des Ipécas, se réalise par action directe du chlorure d'acétyle au point d'application de la chromatoplaque.

lobéline 1 -CHOH ⟶ dérivé monoacétylé.

lobélanidine 2 -CHOH ⟶ dérivés mono- et diacétylés.

Sensibilité :

Voir alcaloïdes du groupe de l'émétine.

Spécificité :

Voir alcaloïdes de l'opium.

Remarque :

La lobéline étudiée, dont le pouvoir rotatoire est presque nul, se sépare en deux spots après migration; ceci laisse donc supposer que nous sommes en présence de lobéline racémique, et que la chromatographie sur couche mince, permet une séparation des deux stéréoisomères. D'ailleurs, lors de la condensation de la lobéline avec le chlorhydrate de semicarbazide, on obtient également deux spots qui correspondent aux semicarbazones optiquement actives. Les acétyllobélines, par contre, ne se séparent que difficilement dans le solvant V (voir tableau III).

c) Oxydation par l'anhydride chromique :

L'action oxydante de l'anhydride chromique en milieu acétique, transforme lobéline et lobélanidine en lobélanine qui est la dicétone correspondante (46).

Technique :

La réaction se fait au point d'application de la chromatoplaque, en déposant à plusieurs reprises sur l'alcaloïde une solution d'anhydride chromique à 10 % (p/v) dans l'acide acétique concentré. Puis on chasse l'excès d'acide par un passage de la plaque à l'étuve.

Sensibilité :

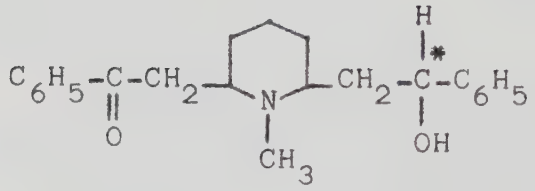
Lorsqu'on prolonge le contact du réactif avec l'alcaloïde durant 20 minutes environ, la réaction est totale et nécessite 5 μg d'alcaloïde au départ.

Spécificité :

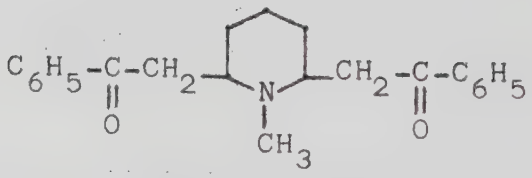
Cette réaction n'est spécifique que par la valeur du R_F de la lobélanine obtenue après réaction.

Figure 4 - Formules des alcaloïdes du groupe de la lobéline.

LOBÉLINE



LOBÉLANINE



LOBÉLANIDINE

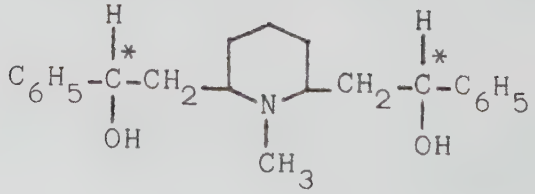


Tableau III

Couleurs de révélation et valeurs de R_F des alcaloïdes du groupe de la lobéline

Alcaloïde	Coloration avec le réactif iodoplatinique	R_F			
		Solvant I	Solvant III	Solvant IV	Solvant V
Lobéline (2 spots)	brun rouge brun rouge	0,72 0,65	0,27 0,19	0,78 0,68	0,21 0,16
Lobélanidine	bleu violacé	0,66	0,17	0,64	0,19
Lobélanine	brun rouge	0,72	0,42	0,80	0,28
Acétyllobéline (parfois 2 spots)	brun rouge brun rouge	0,80	0,57 0,52	0,85	0,47
Monoacétyllobélanidine	bleu violacé	0,79	0,50	0,86	0,40
Diacétyllobélanidine	bleu violacé		0,63		0,58
Monosemicarbazone de la lobélanine	bleu violacé	0,52	0,08	0,53	0,00
Disemicarbazone de la lobélanine	bleu violacé	0,26	0,00	0,17	0,00
Semicarbazone de la lobéline (2 spots)	bleu violacé bleu violacé	0,54 0,48	0,06 0,00	0,54 0,35	0,00 0,00

- Solvant I : chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1.
- Solvant III : cyclohexane-chloroforme-diéthylamine 5-4-0,5.
- Solvant IV : chloroforme-diéthylamine 9-1.
- Solvant V : cyclohexane-diéthylamine 9-1.

Les colorations ont été observées après exposition de la plaque à 120°C , température pour chasser la diéthylamine.

Avec le réactif de Dragendorff, tous les alcaloïdes donnent une coloration orangée.

Chapitre III

ALCALOÏDES DE L'OPIUM ET DÉRIVÉS DE SYNTHÈSE

A - TRAVAUX ANTÉRIEURS.

Par suite de l'importance de l'opium et de ses alcaloïdes tant en pharmacie qu'en toxicologie, les travaux antérieurs en CCM sont particulièrement nombreux. Ils concernent surtout les six principaux alcaloïdes : morphine, codéine, thébaïne, papavérine, noscapine, narcéine.

Dès 1960, MACHATA (52) utilise la CCM pour la caractérisation des alcaloïdes de l'opium dans le contenu stomacal et la bile d'un individu empoisonné par la teinture d'opium. TEICHERT et coll. (118, 119) sont les premiers à préconiser plusieurs systèmes solvants, séparant les six principaux alcaloïdes de l'opium sur plaques de cellulose; la meilleure séparation est obtenue avec le mélange diméthylformamide-diéthylamine-éthanol 94 % - acétate d'éthyle 5-2-20-75.

En 1961, dans le même but, WALDI et coll. (127) opèrent sur plaques de kieselgel G en utilisant le système solvant chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1. Avec le même adsorbant, BÄUMLER et RIPPSTEIN (5) proposent la séparation avec le mélange méthanol-acétone-triéthanolamine 50-50-15. HERMANEK et coll. (31) donnent la préférence aux plaques d'alumine et effectuent le développement avec le mélange benzène-éthanol 9-1. NEUBAUER et MOTHES (68) séparent 10 alcaloïdes de l'opium sur plaques de kieselgel G avec le mélange benzène-méthanol 80-20; ils photographient les taches isolées au réactif de Dragendorff et font une évaluation semiquantitative des alcaloïdes par photométrie des taches noires du positif.

En 1962, COCHIN et DALY (13) se servent de la CCM pour caractériser la morphine et des analgésiques de synthèse dans l'urine. PINXTEREN et VAN VERLOOP (79, 80) séparent la pseudomorphine de la morphine et de la narcotoline sur plaques de kieselgel G avec le système solvant tétrachlorure de carbone-n-butanol-méthanol-ammoniaque 6 N 40-30-30-2; ils évaluent la morphine dans les capsules de Pavot en la transformant en pseudomorphine à fluorescence intense par action du ferrocyanure de potassium directement sur la chromatoplaque. A la même époque, dans une série de publications, POETHKE et KINZE (83, 84, 85) préconisent la CCM bidimensionnelle pour séparer les six principaux alcaloïdes de l'opium; ils opèrent sur plaque d'alumine sans liant et développement successivement avec les mélanges benzène-méthanol-acide formique 90-10-1 et benzène-acide acétique 90-10, le deuxième mélange étant destiné à séparer papa-

vérine et noscapine qui ont sensiblement les mêmes R_F avec le premier; ils éluent des plaques les alcaloïdes autres que la morphine et, après addition d'acide picrique, ils les dosent par photocolorimétrie.

En 1963, IKRAM et coll. (36) obtiennent une bonne séparation morphine-codéine-noscapine-papavérine sur plaques d'alumine sans liant, avec le chloroforme pour le développement. RAMAUT (93) préconise les plaques de kieselgel G et le mélange hexane-cyclohexane-cyclohexanol 33-33-33, additionné de 5 % de diéthylamine pour séparer les principaux alcaloïdes de l'opium. Dans le même but, KAMP et coll. (39) mettent au point une méthode de CCM bidimensionnelle sur plaques de silice avec les systèmes solvants éther de pétrole-éther-éthanol-diéthylamine 4-16-2-1 et tétrachlorure de carbone-butanol-méthanol-ammoniaque 10 % 40-30-30-2. CHICHIRO (12) utilise le mélange chloroforme-acétone-ammoniaque 25 % 12-24-1 pour identifier les alcaloïdes des comprimés parégoriques.

Les travaux les plus nombreux ont paru en 1964, sans apporter d'améliorations notables aux méthodes déjà décrites. FUMAGILLI et coll. (25) séparent les principaux alcaloïdes de l'opium sur plaques de silice avec le mélange benzène-méthanol-diéthylamine 80-19-1; ils effectuent le dosage des alcaloïdes autres que la morphine dans les préparations opiacées par planimétrie des spots révélés au réactif de Dragendorff. RAGAZZI et coll. (92) séparent les mêmes alcaloïdes à l'aide du mélange hexane-acétone 3-2 sur plaques de magnésie imprégnées de chlorure de calcium. BAYER (6) utilise comme adsorbant la silice et pour le développement le système solvant xylol-méthyléthylcétone-méthanol-diéthylamine 20-20-3-1. Opérant sur plaques de kieselgel G, DÁNOS (15) préconise le développement successif, dans le même sens, avec les mélanges benzène-méthanol 9-1 et chloroforme-éthanol-acétate d'éthyle-acétone 60-20-10-10. Avec le même adsorbant, DRYON (20) sépare morphine, codéine, noscapine, narcéine et des analogues de synthèse à l'aide du mélange acétone-méthanol-ammoniaque 17 % 50-50-1. MULÉ (64) utilise le système solvant éthanol-dioxanne-benzène-ammoniaque 1-8-10-1 pour identifier dans l'urine de nombreux analgésiques azotés, dont la morphine et la codéine. LEAL (45) extrait les alcaloïdes de l'opium par chromatographie sur colonne, puis les sépare sur plaques de kieselgel G avec le mélange éthanol-chloroforme 9-1. SZABO et coll. (115) procèdent d'une façon analogue, mais en développant avec le mélange toluène-méthanol-chloroforme 100-40-20. NONCLERCQ et NYS (70) caractérisent codéine et codéthyline dans les sirops, sur plaques de silice, avec les mélanges n-butanol-acide acétique-eau 100-64-45 et chloroforme-éther-méthanol-ammoniaque 25 % 60-25-25-1. SCHWARZ et ŠARŠUNOVÁ (108) identifient les alcaloïdes majeurs de l'opium dans les préparations pharmaceutiques sur plaques

d'alumine sans liant en développant avec le mélange éther-éthanol 95-5.

Au cours de ces dernières années, les publications dans ce domaine ont été beaucoup moins nombreuses. En 1965, STEELE (114) caractérise les alcaloïdes de l'opium dans des préparations qui en contiennent par CCM sur plaques de kieselgel G avec le système solvant acétate d'éthyle-benzène-acétonitrile-ammoniaque 50-30-15-5. PREININGER et coll. (90) utilisent également la CCM pour identifier, dans les graines de Pavot, les principaux alcaloïdes par CCM sur plaques de silice avec les mélanges hexane-chloroforme-méthanol 25-65-10 et 40-52-8. HEUSSER et JACKWERTH (32, 33) isolent la morphine par CCM préparative et la dosent sous forme de nitrosomorphine par photocolorimétrie à 470 mμ.

L'année suivante, PARIS et FAUGERAS (73) proposent un dosage par CCM de la morphine dans les capsules de Pavot; après isolement, la morphine est développée sur plaque de silice, révélée à l'état de nitrosomorphine et dosée par densitométrie. VIGNOLI et coll. (124) différencient les alcaloïdes de l'opium par une méthode de CCM bidimensionnelle et appliquent cette technique à leur caractérisation dans des échantillons d'opium d'origine douteuse. PFEIFER (78) caractérise les alcaloïdes dans différentes espèces du genre Papaver par CCM sur plaques de silice avec le mélange benzène-acétone-méthanol 7-2-1. WARTMANN-HAFNER (128) standardise l'analyse par CCM des préparations opiacées,en comparant les travaux antérieurs et en préconisant le kieselgel G et le mélange diméthylformamide-diéthylamine-éthanol-acétate d'éthyle 5-2-20-75, selon TEICHERT et coll..

En 1967, FAIRBAIRN et coll. (21) mettent au point un dosage par CCM de la papavérine et de la noscapine dans l'opium et les préparations opiacées; ils extraient ces alcaloïdes par une méthode de CCM quantitative et les dosent ensuite par spectrophotométrie. D'autre part, HUANG et coll. (34) séparent les principaux alcaloïdes de l'opium sur plaques de polyamide avec le système solvant cyclohexane-acétate d'éthyle-n-propanol-diméthylamine 30-2,5-0,9-0,1.

B - TRAVAUX PERSONNELS.

Malgré les nombreux travaux de chromatographie sur couche mince consacrés à ce groupe d'alcaloïdes, l'identification de ces derniers s'avère difficile soit par suite de la complexité des mélanges naturels d'alcaloïdes, soit par la grande variété des analogues de synthèse.

Dans ce groupe, nous avons retenu aussi bien les principaux alcaloïdes isoquinoléniques (papavérine, noscapine, narcéine) que phénanthréniques (morphine, codéine, thébaïne), ainsi que quelques dérivés de synthèse (codéthyline, pholcodine, diamorphine, apomorphine).

1) TRANSFORMATIONS FONCTIONNELLES.

a) Acétylation :

Grâce à la présence de groupements -OH alcooliques ou phénoliques, certains alcaloïdes peuvent former des dérivés acétylés moins polaires, donc à R_F plus élevés dans les solvants usuels :

morphine (2 -OH) : dérivés monoacétylé et diacétylé (= diamorphine).
codéine, codéthyline, pholcodine (1 -OH) : dérivé monoacétylé.
autres alcaloïdes : sans action.

Technique :

Parmi les agents d'acétylation essayés, le chlorure d'acétyle a donné les réactions les plus complètes. La réaction se fait directement au point d'application de la chromatoplaque : on dépose une fine goutte de solution et quelques gouttes de chlorure d'acétyle; après 2 à 3 minutes de contact, on volatilise le réactif en excès par chauffage de la plaque à 120°C pendant 10 minutes; puis on laisse refroidir la plaque dans un exsiccateur, jusqu'au moment du développement.

Sensibilité :

Pour les alcaloïdes à 1 -OH, la transformation en dérivé monoacétylé se fait avec un rendement de près de 100 %; pour la morphine, il apparaît deux spots d'intensités comparables, dus aux dérivés mono- et diacétylés (voir figure 7). La sensibilité de la réaction est d'environ 5 à 10 μg d'alcaloïde.

Spécificité :

Dans les préparations opiacées, l'acétylation permet de compléter l'identification de la morphine et de la codéine. La plu-

part des alcaloïdes à groupements -OH réagissent avec le chlorure d'acétyle (par ex. yohimbine, quinine, homatropine), mais leurs dérivés acétylés ont des R_F nettement différents en général.

Vis-à-vis de l'atropine, le chlorure d'acétyle agit comme déshydratant avec formation d'apoatropine; en effet, le produit de transformation traité par la potasse alcoolique ne régénère pas l'atropine, contrairement aux dérivés d'acétylation des autres alcaloïdes à groupement -OH, traités dans les mêmes conditions.

Remarque :

La diamorphine (= héroïne) peut être caractérisée en CFCM par formation de morphine par l'action de la potasse alcoolique.

b) Oxydation par l'acide p-nitroperbenzoïque :

Cet acide conduit à la formation des génalcaloïdes correspondants ou d'époxydes. On opère avec une solution éthérée à 2 p. 100 (p/v) en tube capillaire à 100°C pendant une heure.Les alcaloïdes de l'opium ou leurs dérivés réagissant dans ces conditions sont : morphine, codéine, codéthyline, pholcodine, papavérine et thébaïne. (Voir figure 7 et tableau IV).

Cette réaction permet l'identification de ces alcaloïdes, en particulier la distinction papavérine-noscapine, toujours difficile en chromatographie sur couche mince.

Sensibilité et spécificité :

Comme le rendement de la réaction est d'environ 50 p.100 sans diminution de la sensibilité de révélation, la sensibilité de la réaction est voisine de 10 μg d'alcaloïdes. La réaction, donnée également par les alcaloïdes du groupe de l'atropine, n'est spécifique que par les R_F des produits de transformation.

c) Transformation particulière à la narcéine :

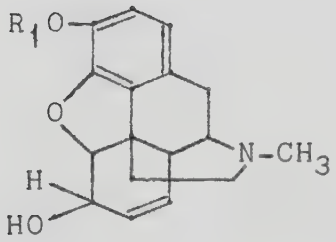
Réactif :

Borohydrure de sodium + anhydride acétique (ou chlorure d'acétyle).

Le borohydrure de sodium réduit sélectivement les groupements carbonyle des alcaloïdes en groupements alcooliques. Parmi les alcaloïdes de l'opium, seule la narcéine est réduite : (-CO--CHOH-).

D'après le R_F élevé de la narcéine réduite (voir figure 7), voisin de celui de la noscapine, il est très probable que la réduction soit suivie d'une lactonisation entre la fonction -CHOH- créée et la fonction acide -COOH- de la narcéine. L'hypothèse d'une lactonisation est renforcée par deux arguments :

Figure 6 - Formules des alcaloïdes de l'opium



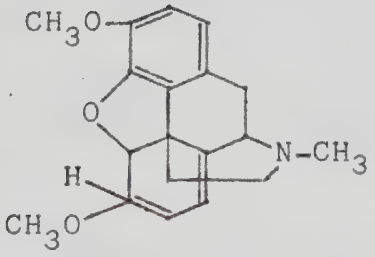
MORPHINE $R_1 = H$

CODÉINE $R_1 = CH_3$

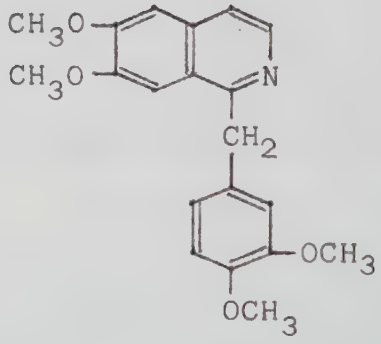
CODÉTHYLINE $R_1 = C_2H_5$

PHOLCODINE $R_1 = -CH_2-CH_2-N$

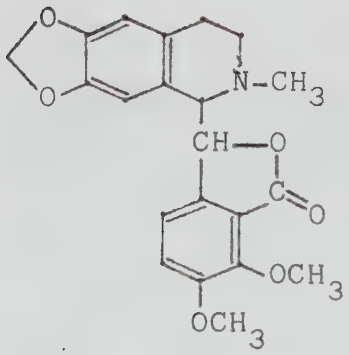
THÉBAÏNE



PAPAVÉRINE



NOSCAPINE



NARCÉINE

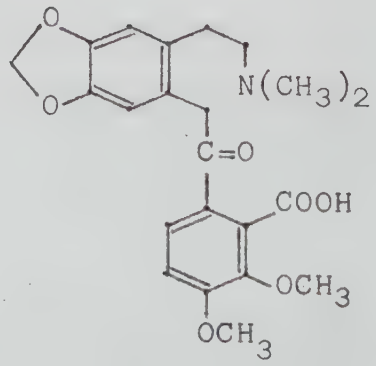


Tableau IV

Couleurs des révélations et valeurs des R_F des alcaloïdes de l'opium

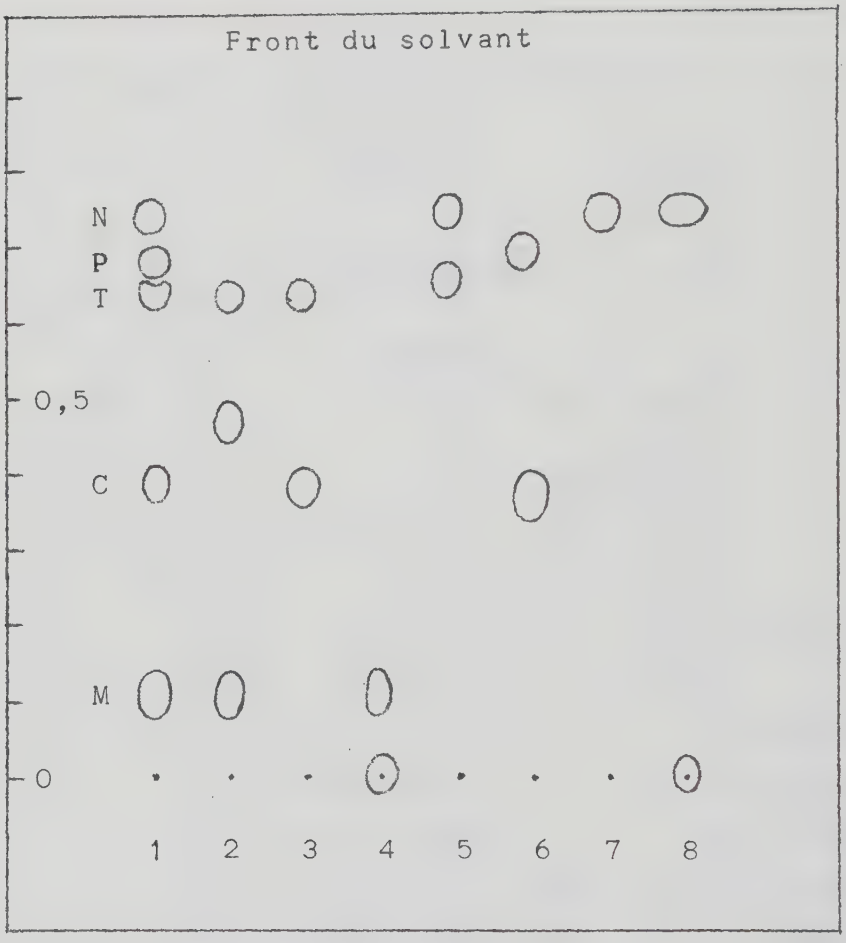
Alcaloïde	Fluorescence à 365 mμ	Coloration avec le réactif iodoplatinique	R_F	
			Solvant I	Solvant VI
Morphine	bleue	bleu gris	0,08 (0,10)	0,03
Pholcodine		bleu violacé	0,35	0,26
Codéthyline		bleu violacé	0,43	0,38
Codéine		bleu violacé	0,38 (0,38)	0,38
Thébaïne		brunâtre	0,64 (0,65)	0,69
Papavérine	jaune pâle	jaune	0,67 (0,67)	0,73
Noscapine	bleue	jaune	0,73 (0,72)	0,71
Narcéine	bleue faible	bleue	0,00	0,00
Cotarnine	jaune vert	bleu violacé	0,60 (0,60)	0,26
Apomorphine	bleue	verte	traînée	traînée
Monoacétylmorphine	bleue	bleu gris	0,46	0,46
Diamorphine	bleue	bleu gris	0,63	0,65
Acétylpholcodine		bleu violacé	0,60	0,68
Acétylcodéthyline		bleu violacé	0,64	0,69
Acétylcodéine		bleu violacé	0,63	0,71
Narcéine réduite	bleue sombre	bleu violacé	0,73	0,00
Morphine oxydée		bleu violacé	0,00	0,14
Pholcodine oxydée		bleu violacé	0,16	0,15
Codéthyline oxydée		bleu violacé	0,18	0,12
Codéine oxydée		bleu violacé	0,17	0,82
Thébaïne oxydée		gris	0,73	0,40
Papavérine oxydée		bleu violacé	0,36	

Solvant I : chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1.
Solvant VI : chloroforme-cyclohexane-diéthylamine 7-2-1.

Les colorations et les fluorescences ont été observées après exposition de la plaque à 120°C, température nécessaire pour chasser la diéthylamine. Avec le réactif de Dragendorff, tous les les alcaloïdes donnent une coloration orangée, à l'exception de la narcéine (col. bleue) et de l'apomorphine (col. verte).

Entre parenthèses, figurent les R_F trouvés par WALDI et coll. (127).

Figure 7 - Transformations fonctionnelles des alcaloïdes de l'opium.



Adsorbant : kieselgel G.

Solvant : chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1.

M = morphine; C = codéine; T = thébaïne: P = papavérine; N = noscapine.

Lire de bas en haut :

1. Préparation opiacée.
2. Morphine, dérivés mono- et diacétylés.
3. Codéine et monoacétylcodéine.
4. Morphine et son produit d'oxydation.
5. Thébaïne - produit d'oxydation.
6. Papavérine - produit d'oxydation.
7. Noscapine.
8. Narcéine - produit de réduction.

1°) le produit de réduction de la narcéine présente une fluorescence bleue comme la noscapine;

2°) le rendement de la formation de ce produit de réduction est nettement augmenté, si on opère en présence d'un déshydratant (anhydride acétique ou chlorure d'acétyle).

Technique :

Sur le spot de l'alcaloïde au point d'application de la chromatoplaque, on dépose une ou plusieurs gouttes de solution à 1 % (p/v) de $NaBH_4$ dans l'éthanol absolu; on laisse sécher, puis on dépose deux ou trois gouttes d'anhydride acétique (ou de chlorure d'acétyle); après quelques minutes de contact, on procède au développement de la chromatoplaque.

Sensibilité :

Assez faible sans déshydratant, elle est de l'ordre de 10 µg en présence d'anhydride acétique.

2) APPLICATION DES TRANSFORMATIONS FONCTIONNELLES AUX PRÉPARATIONS PHARMACEUTIQUES.

Lorsqu'il s'agit d'un alcaloïde ou d'un mélange de deux alcaloïdes, la lecture de la chromatoplaque après transformation fonctionnelle est relativement simple. Par contre, dans le cas des mélanges complexes tels que l'opium (cinq spots d'alcaloïdes avec les solvants utilisés), l'interprétation d'une chromatoplaque après transformation fonctionnelle s'avère difficile; il est nécessaire alors d'opérer par comparaison avec des alcaloïdes témoins. On peut également séparer les alcaloïdes de l'opium en première dimension, puis effectuer les transformations fonctionnelles et développer les produits de transformation en deuxième dimension.

a) Solutés aqueux d'alcaloïdes purs :

Les transformations fonctionnelles sont réalisées soit directement sur les solutés, soit après concentration. Elles sont applicables directement aux solutés injectables de morphine, de papavérine, seules ou associées à d'autres alcaloïdes.

b) Sirops de pholcodine (1 p.1000), de codéine (2 p.1000), de codéthyline (1 p.1000) :

On extrait les alcaloïdes sur 2 à 5 ml de sirop par le chloroforme en milieu alcalin.

On peut également utiliser la technique que nous indiquons dans la cinquième partie de ce travail.

c) Teinture d'opium :

Sur 5 µl de teinture, on peut caractériser les principaux alcaloïdes de l'opium. La réaction d'acétylation peut être réalisée directement sur la teinture non purifiée. Par contre, l'action de l'acide p-nitroperbenzoïque doit s'effectuer de préférence sur la teinture purifiée (la purification se fait comme pour la teinture de Belladone, mais sur colonne d'alumine sans charbon).

d) Teinture d'opium benzoïque (Elixir parégorique) :

On opère comme pour la teinture, mais en concentrant davantage la solution.

e) Extrait d'opium :

On est ramené à la teinture par dissolution dans l'alcool à 70°.

f) Poudre d'opium et poudre de Dover :

Par suite de la teneur élevée de l'opium en alcaloïdes, on obtient une extraction suffisante en épuisant la poudre par l'alcool à 70° dans la pipette effilée qui sert à déposer la solution extractive sur la chromatoplaque.

g) Suppositoires à base d'extrait d'opium :

Si l'excipient est soluble dans l'éther de pétrole, on opère suivant la technique que nous avons indiquée pour la pommade belladonée.

Conclusions.

L'application de la CFCM aux préparations galéniques de l'opium est possible, mais rendue difficile par la présence de cinq spots d'alcaloïdes avant transformation fonctionnelle. Par contre, la CFCM est aisément applicable aux préparations pharmaceutiques les plus variées contenant un alcaloïde ou un mélange d'alcaloïdes. Morphine, codéine, codéthyline et pholcodine peuvent être caractérisées par acétylation ou action de l'acide p-nitroperbenzoïque; cependant codéine et codéthyline ne peuvent être différenciées par CFCM; la différenciation de ces deux alcaloïdes en chromatographie sur couche mince ne se fait aisément que par les propriétés physiques des deux alcaloïdes. La papavérine donne une transformation fonctionnelle spécifique avec l'acide p-nitroperbenzoïque.

Chapitre IV

ALCALOÏDES DES IPÉCAS

A - TRAVAUX ANTÉRIEURS.

Dans leur méthode générale de séparation des alcaloïdes, WALDI et coll. (127) donnent les R_F de l'émétine et de la céphéline avec plusieurs systèmes solvant sur plaques de silice G. STAHL (111) préconise un double développement, également sur plaques de silice G, avec le système solvant chloroforme-méthanol 85-15. MACHOVIČOVÁ et coll. (53) ont utilisé la CCM pour contrôler la pureté et la stabilité des solutés injectables de chlorhydrate d'émétine. Après isolement des alcaloïdes de la racine d'Ipéca, SCHILCHER (104) sépare émétine et céphéline sur plaques de silice alcalines à l'aide de chloroforme contenant 2 à 5 % de méthanol; après isolement à partir des plaques, le même auteur dose l'émétine par un procédé colorimétrique. WARTMANN-HAFNER (128) caractérise les alcaloïdes des Ipécas dans les préparations galéniques à l'aide du mélange chloroforme-méthanol 85-15 de STAHL sur plaques de silice G. Récemment LUCKNER et BESSLER (50), dans une proposition pour le D.A.B. 7 (septième édition de la Pharmacopée allemande), préconisent le solvant et le révélateur de STAHL pour la caractérisation par CCM de la racine d'Ipéca.

Pour la révélation en CCM, STAHL (111) préconise la pulvérisation d'une solution d'iode à 5 % dans le chloroforme; après 15 minutes de chauffage à 60°C, les alcaloïdes apparaissent en jaune ou en brun clair à la lumière du jour et présentent, dans l'ultra-violet, une fluorescence jaune ou bleue; la réaction est extrêmement sensible (0,01 μg).

B - TRAVAUX PERSONNELS.

Les transformations fonctionnelles que nous avons étudiées concernent l'émétine, principal alcaloïde des Ipécas, non phénolique, et la céphéline, alcaloïde des Ipécas, présentant un groupement phénolique libre. Elles permettent une caractérisation des alcaloïdes dans les préparations galéniques d'Ipéca, même très diluées telles que le sirop.

1) TRANSFORMATIONS FONCTIONNELLES.

a) Oxydation par l'acétate mercurique :

L'action de l'acétate mercurique en milieu acétique à chaud sur le chlorhydrate d'émétine, conduit à un produit d'oxydation de couleur jaune qui est la rubrémétine ou déhydroémétine (4); en milieu acide, l'oxydation de la céphéline par l'acétate mercurique produit également une coloration jaune. En présence d'un alcali volatil (ammoniaque ou diéthylamine), la coloration jaune de la céphéline oxydée vire au rouge violacé, celle de la rubrémétine n'est pas modifiée (voir tableau V).

Technique :

Dans un tube capillaire, on fait agir, sur une solution alcoolique des alcaloïdes, une solution d'acétate mercurique à 5 % (p/v) dans l'acide acétique concentré à 160°C pendant une heure. En fin de réaction, on dépose le contenu du microtube au bas de la plaque que l'on place à l'étuve à 110°C pendant 10 minutes, afin de chasser l'excès d'acide acétique. Puis on développe la plaque dans le solvant méthyléthylcétone-éthanol à 95° - ammoniaque (d = 0,925) 5-4-1.

Sensibilité :

Dans les conditions opératoires que nous indiquons, le rendement de la réaction est voisin de 70 %; BATTERSBY et OPENSHAW (4) avaient obtenu un rendement de 45 %. Comme les produits formés ont une coloration propre très intense et une fluorescence très nette, la sensibilité de la réaction est de l'ordre de 0,5 µg .

Spécificité :

Parmi les alcaloïdes que nous avons étudiés, aucun autre ne donne une réaction colorée comparable.

b) Acétylation :

Par l'action du chlorure d'acétyle sur les alcaloïdes déposés au point d'application de la chromatoplaque, l'émétine

sans groupement -OH libre reste intacte, la céphéline à un groupement -OH libre est transformée en acétylcéphéline à R_F nettement plus élevé (voir tableau V).

Technique :

Voir alcaloïdes de l'opium.

Sensibilité :

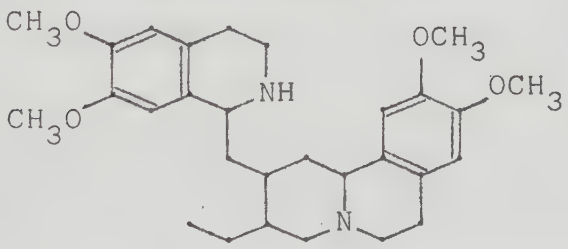
La réaction se fait avec un rendement de 50 %, ce qui porte sa sensibilité à environ 5 µg .

Spécificité :

Voir alcaloïdes de l'opium.

Figure 8 - Formules d'alcaloïdes des Ipécas.

ÉMÉTINE



CÉPHÉLINE

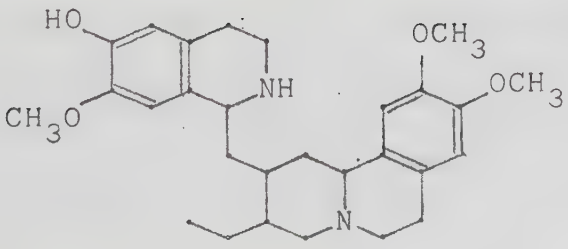


Tableau V

Couleurs de révélation et valeurs de R_F des alcaloïdes du groupe de l'émétine

Alcaloïde	Fluorescence	Coloration avec le réactif iodoplatinique	R_F	
			Solvant I	Solvant VII
Émétine	bleue	bleu violacé	0,70	0,80
Céphéline	bleue	bleu violacé	0,43	0,77
Rubrémétine	jaune	brune	0,04	0,42
Céphéline oxydée	brunâtre	brune	0,00	0,32
Acétylcéphéline	bleue	bleu violacé	0,74	0,80

Solvant I : chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1.

Solvant VII : méthyléthylcétone-éthanol-ammoniaque (d = 0,925) 5-4-1.

Les colorations et les fluorescences ont été observées après exposition de la plaque à 120°C, température nécessaire pour chasser la diéthylamine. Avec le réactif de Dragendorff, tous les alcaloïdes donnent une coloration orangée.

2) APPLICATION DES TRANSFORMATIONS FONCTIONNELLES AUX PREPARATIONS PHARMACEUTIQUES.

a) Teinture d'Ipéca (Codex 1965 : 0,2 % alcaloïdes totaux) :

Les transformations fonctionnelles sont applicables directement sur la teinture : l'action de l'acétate mercurique en tube capillaire sur 2 µl de teinture d'Ipéca permet déjà d'observer les spots colorés de l'émétine et de la céphéline oxydées; l'acétylation de la céphéline est réalisable sur 10 µl de teinture.

b) Poudre d'Ipéca (Codex 1965 : 2 % alcaloïdes totaux) :

On ramène le problème à celui de la teinture en imprégnant d'alcool à 70° la poudre contenue dans la pipette effilée qui sert à déposer le soluté extractif sur la chromatoplaque.

c) Sirop d'Ipéca (Codex 1949 : 0,06-0,08 % alcaloïdes totaux) :

On triture 1 ml de sirop avec 5 g d'alumine Merck au mortier et on laisse sécher la masse ainsi obtenue. Après dessiccation, l'adsorbant est placé dans une microcolonne et on élue par 20 ml de chloroforme. L'identification des alcaloïdes est possible sur le résidu d'évaporation soit par simple chromatographie, soit après transformation fonctionnelle.

Conclusions.

Les deux principaux alcaloïdes des Ipécas, émétine et céphéline, s'oxydent par action de l'acétate mercurique à chaud. La coloration propre et la fluorescence des produits d'oxydation, facilitent la caractérisation des alcaloïdes envisagés soit à l'état pur, soit dans les préparations galéniques. L'acétylation par le chlorure d'acétyle de la céphéline met en évidence son groupement -OH libre, absent chez l'émétine.

Chapitre V

ALCALOÏDES DU GROUPE DE LA STRYCHNINE

A - TRAVAUX ANTÉRIEURS.

Les solvants I, II et III de WALDI et coll. (127) permettent une bonne séparation de la strychnine et de la brucine. Pour faciliter la caractérisation de la strychnine en toxicologie, RUSIECKI et HENNEBERG (100) inhibent la brucine au point d'application de la chromatoplaque en l'oxydant à l'aide d'une solution de bichromate de potassium. GRANDOLINI et coll. (27) mettent au point une technique de CCM bidimensionnelle en vue de la séparation de 12 alcaloïdes du groupe de la strychnine, en utilisant successivement le mélange chloroforme-méthanol 4-1 et le n-butanol-chlorhydrique 19-1 saturé d'eau. Pour le fractionnement des alcaloïdes des Strychnos, CAGGIANO et MARINI-BETTÒLO (101) utilisent, outre des mélanges chloroforme-méthanol, le méthanol pur et le mélange chloroforme-diéthylamine 9-1.

En 1964, ŠARŠÚNOVÁ et coll. (103), opérant sur silice sans liant avec le mélange benzène-éthanol 9-1, séparent la strychnine et la brucine extraites des préparations galéniques et procèdent à leur dosage radiométrique.

En 1965, POETHKE et KINZE (87) isolent les alcaloïdes de la poudre de noix vomique et séparent strychnine et brucine sur plaques d'alumine avec le mélange éther-éthanol 9-1; puis ils extraient les alcaloïdes à partir de la chromatoplaque par le chloroforme et les dosent par une méthode colorimétrique. La même année, QUIRIN, LÉVY et LE MEN (91) ont également mis à profit la CCM pour l'étude des alcaloïdes du vomiquier. Récemment, WARTMANN-HAFNER (128) préconise les plaques de gel de silice GF 254 avec le mélange benzène-acétate d'éthyle-diéthylamine 7-2-1, pour identifier strychnine, brucine et pseudostrychnine dans l'extrait et la teinture de noix vomique.

B - TRAVAUX PERSONNELS.

Dans ce groupe, en dehors de la strychnine, nous avons étudié la brucine (diméthoxystrychnine), les colubrines α et β (méthoxystrychnines) et la vomicine.

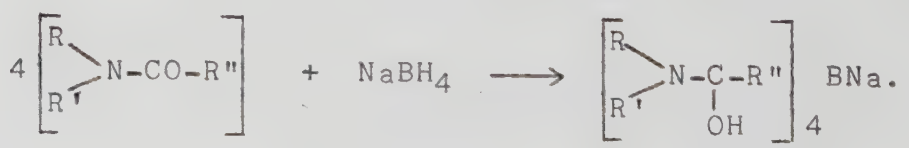
Les réactions colorées classiques et les méthodes chromatographiques ne permettent une identification rigoureuse de la strychnine que par des essais variés; la caractérisation des colubrines et de la vomicine dans les préparations galéniques de noix vomique s'avère difficile par suite des faibles quantités présentes. Les deux transformations fonctionnelles que nous préconisons permettent, par des opérations simples, effectuées sur 10 à 20 μg de substance, de différencier sans discussion, les cinq alcaloïdes étudiés entre eux et par rapport aux autres groupes d'alcaloïdes.

1) TRANSFORMATIONS FONCTIONNELLES.

a) Réduction par le borohydrure de sodium :

Elle permet de différencier la strychnine des quatre autres alcaloïdes. C'est une réaction de MALAQUIN-DENIGÈS modifiée : le mélange zinc + acide chlorhydrique, inapplicable sur chromatoplaque, est remplacé par le borohydrure de sodium en solution éthanolique; après développement, seul le spot de la strychnine réduite (R_F = 0,52 dans le solvant I) se révèle en rose par le nitrite de sodium en solution nitrique (voir figure 10).

Si on révèle ensuite la même chromatoplaque par l'iodoplatinate de potassium, on constate l'apparition de spots nouveaux (voir tableau VI), non seulement pour strychnine (R_F = 0,74 dans le solvant I), mais aussi pour brucine, colubrines et vomicine; les spots nouveaux n'ont pas les mêmes R_F que les dérivés hydrogénés de ces alcaloïdes obtenus par l'action du zinc et de l'acide chlorhydrique. Nous supposons donc que ces spots, à R_F supérieurs aux alcaloïdes de départ, sont dus aux complexes formés avec $NaBH_4$:



Technique :

Sur l'alcaloïde déposé au point d'application de la chromatoplaque, on applique à plusieurs reprises, en l'espace de 10

minutes, une goutte de solution à 1 % (p/v) de $NaBH_4$ dans l'éthanol absolu. Après réactivation de la plaque à l'étuve, on procède à son développement dans le solvant cyclohexane-acétone-diéthylamine 5-4-1. On révèle la strychnine réduite par une solution fraîchement préparée à 1 % (p/v) de $NaNO_2$ dans HNO_3 qui produit une coloration rose rouge (voir figure 10). Après élimination de HNO_3 à l'étuve, la révélation à l'iodoplatinate de potassium fait apparaître les spots des produits de transformation des autres alcaloïdes (voir tableau VI).

Sensibilité :

Malgré le faible rendement de la réaction (30 %), celle-ci est applicable à partir de 20 μg d'alcaloïde par suite de la grande sensibilité de révélation de la strychnine réduite au nitrite de sodium.

Spécificité :

La réaction globale ($NaBH_4$, puis $NaNO_2$ + HNO_3) est spécifique de la strychnine. Par contre, pour les autres alcaloïdes, les spots nouveaux, révélables à l'iodoplatinate, ne sont spécifiques que par leurs R_F; en effet, les alcaloïdes des Quinquinas et la narcéine donnent également des produits de réduction à R_F plus élevé.

b) Oxydation par l'acide nitrique :

L'action de l'acide nitrique sur les cinq alcaloïdes de la noix vomique, déposés au point d'application de la chromatoplaque, permet leur différenciation, même celle des deux colubrines isomères :

- la strychnine et la vomicine restent intactes.
- la brucine est transformée en cacothéline rouge qui est inhibée au point d'application, grâce à la fonction acide libérée par ouverture du cycle lactamique.
- les colubrines α et β, difficilement séparables par simple chromatographie (R_F = 0,46 et 0,44 dans le solvant chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1) donnent des produits d'oxydation à coloration et fluorescence jaunes, à R_F nettement différents (R_F respectifs : 0,51 et 0,24); leur coloration jaune et leur comportement sur chromatoplaque, laissent supposer qu'il s'agit de composés quinoniques analogues à la cacothéline, mais sans ouverture du cycle lactamique.

Technique :

Sur l'alcaloïde au point d'application d'une chromatoplaque, on dépose une goutte de HNO_3 concentré. Après un contact de 15

minutes, on élimine l'excès de réactif par exposition à l'étuve à 120°C pendant 15 minutes, puis on développe dans le solvant chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1. Un spot coloré en rouge au point d'application caractérise la brucine, des spots jaunes à R_F 0,51 et 0,24 caractérisent respectivement les colubrines α et β (voir figure 10). Ces spots sont tous révélables à l'iodoplatinate de potassium.

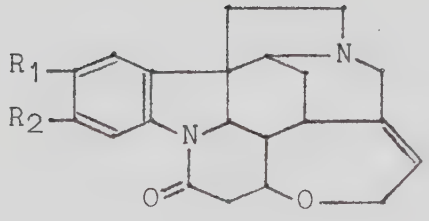
Sensibilité :

La révélation à l'iodoplatinate de potassium est déjà possible pour 2 μg d'alcaloïde : mais 10 μg sont nécessaires pour observer la coloration jaune des produits d'oxydation des colubrines.

Spécificité :

D'autres alcaloïdes, en particulier ceux à structure indolique peuvent produire des colorations avec HNO_3, mais les colorations et les R_F des produits de transformation sont très différents de ceux de la brucine et des colubrines.

Figure 9 - Formules des alcaloïdes du groupe de la strychnine.



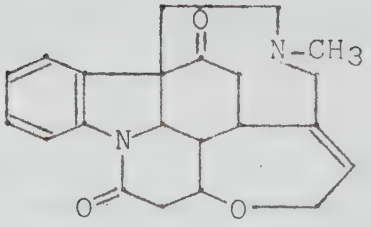
STRYCHNINE : $R_1 = H$, $R_2 = H$

BRUCINE : $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OCH_3$

α-COLUBRINE : $R_1 = H$, $R_2 = OCH_3$

β-COLUBRINE : $R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$

VOMICINE



CACOTHÉLINE

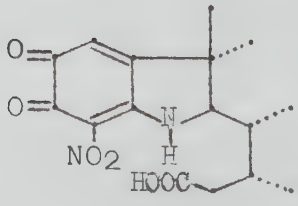


Tableau VI

Couleurs de révélation et valeurs de R_F des alcaloïdes du groupe de la strychnine

Alcaloïde	Coloration avec le réactif iodoplatinique	R_F	
		Solvant I	Solvant VIII
Strychnine	bleu violacé	0,51	0,38
Brucine	bleue	0,43	0,24
α-Colubrine	bleu violacé	0,46	0,32
β-Colubrine	bleu violacé	0,44	0,31
Vomicine	rose violacé	0,74	0,63
Génostrychnine	bleu violacé	0,00	0,00
Strychnine réduite	bleue	0,52	0,46
Complexe (?) Strychnine - $NaBH_4$	gris bleu	0,74	0,62
α-Colubrine oxydée	bleue	0,51	0,35
β-Colubrine oxydée	bleue	0,24	0,15
Brucine oxydée	bleue	0,00	0,00

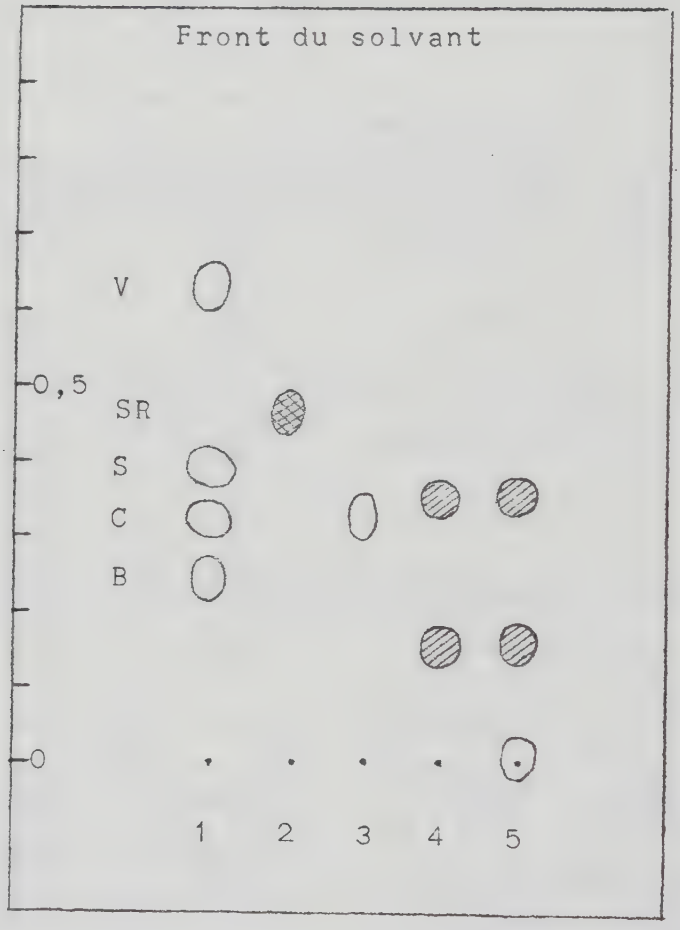
Solvant I : chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1.

Solvant VIII : cyclohexane-acétone-diéthylamine 5-4-1.

Les colorations ont été observées après exposition de la plaque à 120°C, température nécessaire pour chasser la diéthylamine.

Avec le réactif de Dragendorff, tous les alcaloïdes donnent une coloration orangée à l'exception des colubrines oxydées (coloration jaune) et de la brucine oxydée (coloration brune).

Figure 10 - Transformations fonctionnelles des alcaloïdes du groupe de la strychnine.



Adsorbant : kieselgel G.

Solvant I : chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1.

spots jaunes. spots roses.

B = brucine; C = colubrines; S = strychnine; SR = strychnine réduite; V = vomicine.

Lire de bas en haut :

1. Teinture de noix vomique (10 µl).
2. Teinture de noix vomique + $NaBH_4$ (révélation au $NaNO_2$).
3. Colubrines α et β.
4. β-colubrine oxydée, α-colubrine oxydée, sans révélation.
5. Teinture de noix vomique + HNO_3, sans réduction : brucine oxydée, β-colubrine oxydée, α-colubrine oxydée.

2) APPLICATION DES TRANSFORMATIONS FONCTIONNELLES AUX PRÉPARATIONS PHARMACEUTIQUES.

a) Teinture de noix vomique (Codex 1965 : 0,12 % strychnine) :

L'identification des alcaloïdes par leurs R_F nécessite 1 µl de teinture pour strychnine et brucine, 10 µl pour vomicine et colubrines. Pour les transformations fonctionnelles, on dépose la teinture directement au point d'application de la chromatoplaque : un minimum de 20 µl de teinture est nécessaire pour l'identification des colubrines par l'oxydation nitrique, alors que 10 µl sont suffisants pour déceler le spot rose de la strychnine après action du borohydrure de sodium.

b) Extrait de noix vomique (Codex 1965 : 6,25 % strychnine) :

Par dissolution de l'extrait dans l'alcool à 70°, on ramène le problème à celui de la teinture.

c) Poudre de noix vomique (Codex 1965 : 1,2 % strychnine) :

Il suffit d'épuiser la poudre par l'alcool à 70° dans la pipette effilée qui sert à déposer la solution extractive sur la chromatoplaque.

d) Soluté injectable de sulfate de strychnine composé (Codex 1949 : 0,5 mg de strychnine par ml) :

L'application des transformations fonctionnelles ne pose aucun problème particulier.

e) Oenolé :

Cet oenolé à base d'écorce de Quinquina, de sels minéraux, de sucre et de vin, contient 17 mg par litre de sulfate de strychnine. Sur 10 ml d'oenolé, on chasse l'alcool par chauffage au bain-marie. Puis on ramène le résidu à deux fois son volume initial par de l'eau distillée. Après alcalinisation par NH_4OH, on extrait à plusieurs reprises par 10 ml de chloroforme. Les solutions chloroformiques sont évaporées au bain-marie, après avoir été déshydratées par Na_2SO_4 anhydre. La strychnine est alors identifiée sur le résidu par action du borohydrure de sodium.

Remarque :

A partir du même oenolé, nous avons pu extraire la strychnine plus simplement en opérant de la façon suivante : au mortier, on mélange 2 ml d'oenolé avec 5 g d'alumine Merck; après dessiccation du mélange à l'air libre, on le place dans une microcolonne chromatographique et on élue par 20 ml de chloroforme. Les transformations fonctionnelles sont effectuées sur le résidu obtenu par l'évaporation de la solution chloroformique.

Conclusions :

Les transformations fonctionnelles mises au point pour 5 alcaloïdes du groupe de la strychnine, permettent une caractérisation simple, rapide et différentielle de ceux-ci. La réduction par le borohydrure de sodium, suivie d'une révélation de la chromatoplaque par le nitrite de sodium en milieu nitrique, permet la caractérisation de la strychnine par son composé de réduction qui se colore en rose. La réaction d'oxydation par l'acide nitrique différencie les colubrines α et β tout en simplifiant la lecture de la chromatoplaque par inhibition de la brucine au point d'application. Ces transformations sont aisément applicables aux préparations pharmaceutiques (soluté injectable, teinture, extrait) sans traitement préalable.

Chapitre VI

ALCALOÏDES DES RAUWOLFIA

A - TRAVAUX ANTÉRIEURS.

Dès 1959, SCHLEMMER et LINK (105) séparent réserpine et rescinnamine par CCM et, après extraction de la plaque, dosent les alcaloïdes spectrophotométriquement. TEICHERT et coll.(118) séparent sept alcaloïdes des Rauwolfia sur plaques de cellulose imprégnées de formamide avec le mélange heptane-méthyléthylcétone 50-50 en atmosphère d'ammoniaque. WALDI et coll. (127) donnent les R_F de sept alcaloïdes de ce groupe dans cinq systèmes solvants. Egalement en 1961, BÄUMLER et RIPPSTEIN (5) préconisent le système solvant méthanol-acétone-triéthylamine 50-50-1,5 sur gel de silice G. L'année suivante, ULLMANN et KASSALITZKY (121) montrent qu'on peut identifier la réserpine en présence d'émulsionnants comme les tweens en utilisant le gel de silice imprégné de formamide et le système solvant méthyléthylcétone-heptane 2-1. IKRAM et coll. (36) obtiennent une bonne séparation de cinq alcaloïdes des Rauwolfia avec plusieurs systèmes solvants sur alumine sans liant. PATEL et coll. (76) fractionnent quelques alcaloïdes du Rauwolfia vomitoria avec le système dichlorométhane-méthanol 98-2 sur silice, ou le mélange benzène-acétone 1-1 en utilisant l'alumine comme adsorbant.

Au cours des dernières années, la CCM a été également employée lors de l'étude des dérivés d'oxydation et d'hydrolyse de la réserpine par PÖTTER et VOIGT (88), ce qui permet de vérifier la stabilité de la réserpine dans les préparations pharmaceutiques; ces mêmes auteurs (89) préconisent la séparation par CCM de la réserpine et de la 3-isoréserpine en vue de leur dosage spectrophotométrique. WEAVER (129) dose la réserpine dans des préparations pharmaceutiques, soit par l'évaluation planimétrique, soit par densitométrie des spots après migration sur chromatoplaque. WULLEN et STAINIER (132) mettent au point une technique de CCM séparant quantitativement six alcaloïdes des Rauwolfia qui sont ensuite dosés par spectrophotométrie ou par fluorométrie. ULLMANN et KASSALITZKY (122) étudient par CCM l'influence du solvant sur la stabilité de la réserpine.

B - TRAVAUX PERSONNELS.

D'après leur structure chimique, les alcaloïdes que nous avions à notre disposition, peuvent se classer en quatre groupes :

1) Bases quaternaires, colorées en jaune :

serpentine, serpentinine.

2) Alcaloïdes indoliniques tertiaires : ajmaline.

3) Alcaloïdes indoliques tertiaires possédant un noyau E hétérocyclique :

raubasine, réserpinine.

4) Alcaloïdes indoliques tertiaires possédant un noyau E carbocyclique :

réserpine, rescinnamine, yohimbine, déserpidine.

En pharmacie, on utilise actuellement sous forme de comprimés ou de solutés injectables, soit les alcaloïdes purs, soit plusieurs alcaloïdes associés, soit un extrait total d'alcaloïdes de Rauwolfia.

Instabilité et conservation des solutions d'alcaloïdes.

Les solutions témoins de ces alcaloïdes sont à 1 % (p/v) dans l'alcool ou le chloroforme. Les problèmes posés par l'instabilité de ces solutions sont mentionnés dans la mise au point de SAHLI (101) sur les Rauwolfia : les solutions alcaloïdiques jaunissent rapidement avec apparition d'une fluorescence verte à l'U.V.; dans le cas de la réserpine, il se formerait dans un premier temps de la déhydro-3 réserpine qui serait transformée ensuite en lumiréserpine. Afin de retarder l'altération des solutions d'alcaloïdes, nous les conservons à l'abri de la lumière et au froid; malgré ces précautions, la conservation ne peut dépasser quelques jours. Par suite de cet inconvénient, nous n'avons pu mettre au point des transformations fonctionnelles sur les alcaloïdes dont nous n'avions que quelques milligrammes.

1) TRANSFORMATIONS FONCTIONNELLES.

a) Oxydation de la réserpine et de la rescinnamine :

Nous avons mis à profit l'oxydation aisée de ces deux alcaloïdes sous l'influence de la chaleur. En portant la chromatoplaque avant développement à l'étuve à 120°C pendant une heure,

il apparaît un nouveau spot, de R_F légèrement supérieur à celui de la réserpine et de la rescinnamine et présentant une fluorescence brunâtre caractéristique (voir figure 12 et tableau VII).

Sensibilité et spécificité :

Le rendement de la réaction n'est que de 25 à 30 %, mais par suite de la fluorescence des spots, la réaction est applicable à partir de 5 µg d'alcaloïde. On peut d'ailleurs augmenter le rendement de la réaction et par suite la sensibilité en déposant une goutte de solution aqueuse de $KMnO_4$ à 1 % sur l'alcaloïde avant exposition à la chaleur. Cette réaction d'oxydation, très spécifique de la réserpine et de la rescinnamine, permet aisément leur identification dans un mélange d'alcaloïdes.

b) Saponification :

L'action de la potasse alcoolique sur un mélange d'alcaloïdes des Rauwolfia produit le dédoublement des alcaloïdes-esters :

Réserpine ⟶ acide triméthoxybenzoïque + réserpate de méthyle.

Rescinnamine ⟶ acide triméthoxycinnamique + réserpate de méthyle.

Réserpate de méthyle ⟶ acide réserpique + alcool méthylique.

Yohimbine ⟶ acide yohimbique + alcool méthylique.

Serpentine ⟶ acide serpentinique + alcool méthylique.

On opère à 100°C avec la potasse alcoolique N (alcool à 90°) en tube capillaire scellé pendant une heure. Après développement avec le solvant chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1, il apparaît pour la réserpine et la rescinnamine deux nouveaux spots (réserpate de méthyle et acide réserpique), pour la yohimbine le spot de l'acide yohimbique (voir tableau VII et figure 12).

Différenciation réserpine-rescinnamine (voir figure 12) :

Après développement avec le solvant alcalin, les acides triméthoxybenzoïque et triméthoxycinnamique sont restés au point d'application. On peut les différencier par développement dans le sens perpendiculaire à l'aide d'un solvant acide tel que chloroforme-cyclohexane-acide acétique concentré 7-2-1 et révélation par une solution aqueuse à 5 p.1000 de $KMnO_4$. Après pulvérisation du révélateur, l'acide triméthoxycinnamique produit un spot incolore sur fond rose (R_F = 0,70); si on porte la chromatoplaque à l'étuve à 100°C pendant 5 à 10 minutes, le spot de cet acide présente une fluorescence bleue à l'U.V. (sensibilité : 4 à 5 µg d'acide, donc 15 à 20 µg d'alcaloïde). Dans les mêmes conditions, l'acide triméthoxybenzoïque ne donne ni décoloration du permanganate, ni fluorescence.

Remarque :

En développant avec le solvant acide, on observe un deuxième spot d'intensité nettement plus faible, présentant également une fluorescence bleue (R_F = 0,80), dû probablement au triméthoxycinnamate d'éthyle; en effet, ce spot n'apparaît plus en remplaçant la potasse alcoolique par la potasse aqueuse.

c) Acétylation :

Comme pour les alcaloïdes de l'opium, l'acétylation par le chlorure d'acétyle ne modifie que les alcaloïdes à groupements -OH : ajmaline, yohimbine, sarpagine. Mais l'acétylation étant plus difficile à réaliser, il est nécessaire d'opérer en tube capillaire scellé à 100°C pendant une heure.

Pour la yohimbine, il apparaît le spot de la monoacétylyohimbine (voir figure 12), avec la sarpagine, celui de la o-diacétylsarpagine (d'après le spectre d'absorption, il n'existerait pas de dérivé indolique N-acétylé (55)).

Dans le cas de l'ajmaline, si on arrête la réaction après trente minutes, on obtient, après développement, quatre spots qui sont dans l'ordre croissant des R_F (voir figure 12) :

- l'ajmaline non transformée,
- l'ajmaline ayant perdu une molécule d'eau par déshydratation sur le groupement -OH du cycle D (d'après (54)),
- le dérivé monoacétylé de l'ajmaline déshydratée,
- la diacétylajmaline.

Après une heure de réaction, il ne reste plus que le spot de la diacétylajmaline.

Sensibilité :

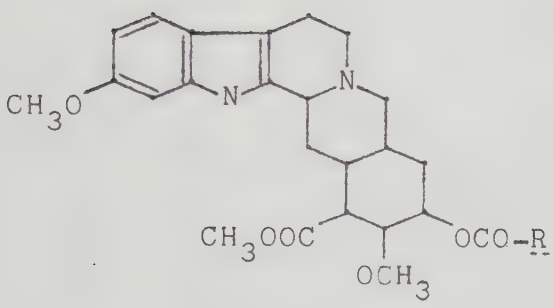
Du fait de l'augmentation du poids moléculaire, la réaction est plus sensible que la saponification (5 à 10 µg d'alcaloïde).

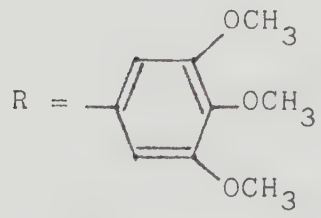
Spécificité :

Voir alcaloïdes de l'opium.

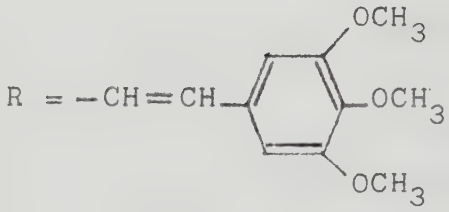
Figure 11 - Formules des alcaloïdes des Rauwolfia.

RÉSERPINE

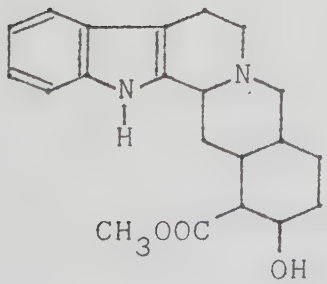




RESCINNAMINE



YOHIMBINE



AJMALINE

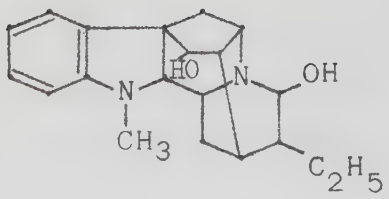


Tableau VII

Couleurs des révélations et valeurs des R_F des alcaloïdes des Rauwolfia

Alcaloïde	Fluorescence à 365 mμ	Coloration avec le réactif iodoplatinique	R_F	
			Solvant I	Solvant VI
Réserpine	jaune verdâtre	bleu violacé	0,72 (0,72)	0,60
Rescinnamine	jaune verdâtre	bleu violacé	0,72	0,60
Raubasine	-	jaune	0,72	0,70
Réserpine	vert sale	bleu violacé	0,72	0,70
Méthoserpidine	orangée	blanche	0,74	0,64
α-Yohimbine	vert clair	bleu violacé	0,63 (0,63)	0,50
β-Yohimbine	vert clair	bleu violacé	0,55	0,26
Ajmaline	-	bleu violacé	0,52 (0,47)	0,38
Serpentine	bleue	bleu violacé	0,40 (0,24)	0,13
Serpentinine	bleue	bleu violacé	0,40 (0,53)	0,13
Sarpagine	-	brun clair	0,17 (0,12)	0,00
Réserpate de méthyle	verte	bleu violacé	0,31	0,11
Acide réserpique	verte	bleu violacé	0,00	0,00
Acide yohimbique	verte	bleu violacé	0,00	0,00
Acide serpentinique	-	bleu violacé	0,00	0,00
Ajmaline déshydratée	-	bleue	0,42	0,48
Acétylyohimbine	vert sale	bleu violacé	0,75	0,74
Monoacétylajmaline	-	bleu violacé	0,73	0,73
Diacétylajmaline	bleue	bleu violacé	0,74	0,82
Diacétylsarpagine	-	bleu violacé	0,72	0,72
Lumiréserpine	brunâtre	bleue	0,77	0,79
Lumirescinnamine	brunâtre	bleue	0,77	0,79

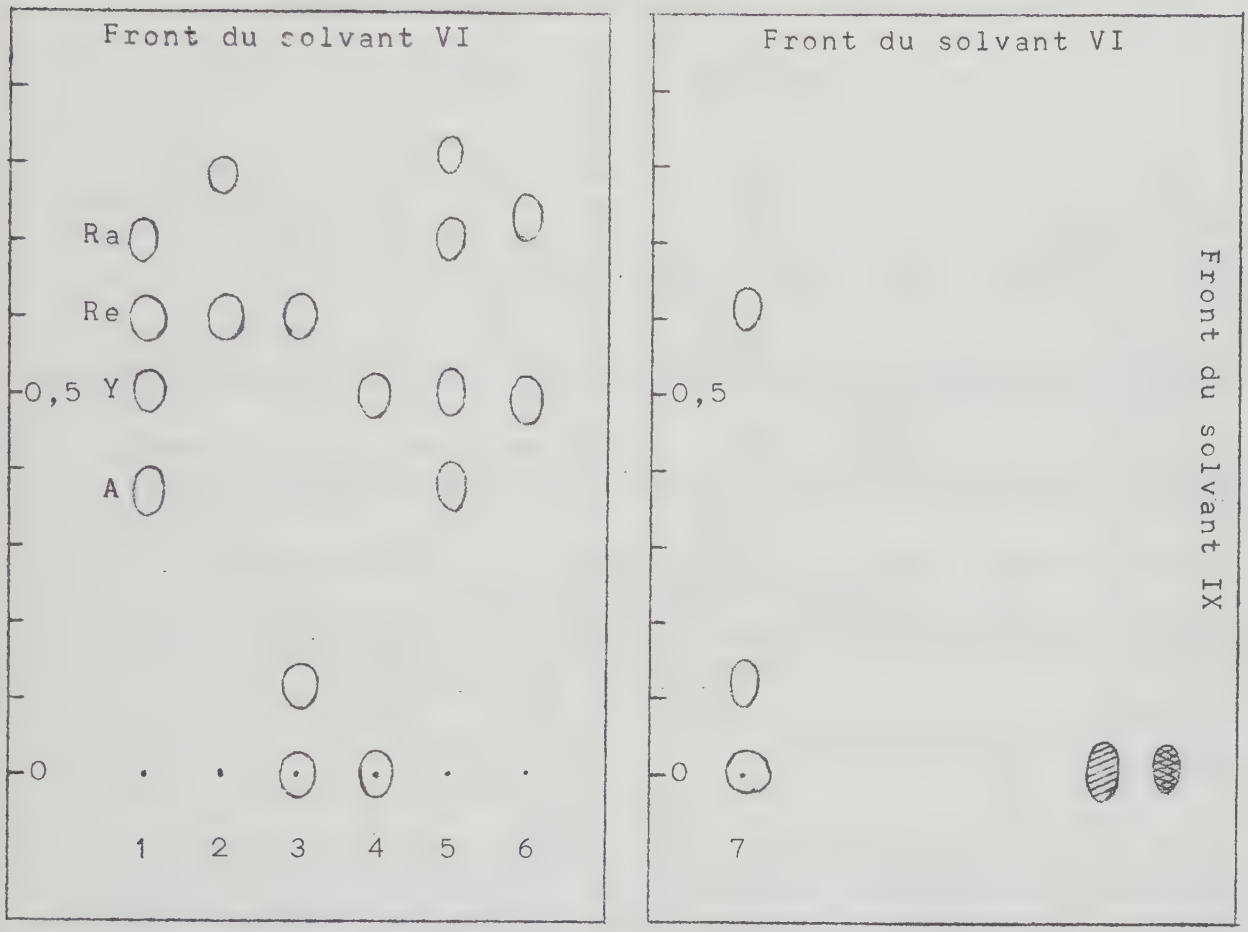
Solvant I : chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1.

Solvant VI : chloroforme-cyclohexane-diéthylamine 7-2-1.

Les colorations et les fluorescences ont été observées après exposition de la plaque à 120°C, température nécessaire pour chasser la diéthylamine. Avec le réactif de Dragendorff, tous les alcaloïdes donnent une coloration orangée.

Entre parenthèses figurent les R_F trouvés par WALDI et coll. (127).

Figure 12 - Transformations fonctionnelles des alcaloïdes des Rauwolfia.



Adsorbant : kieselgel G.
Solvant VI : chloroforme-cyclohexane-diéthylamine 7-2-1.
Solvant IX : chloroforme-cyclohexane-acide acétique concentré 7-2-1.

Lire de bas en haut :

1. A = Ajmaline, Y = Yohimbine, Re = Réserpine + rescinnamine, Ra = Raubasine.
2. Réserpine - lumiréserpine (ou rescinnamine - lumirescinnamine).
3. Acide réserpique - réserpate de méthyle - réserpine.
4. Acide yohimbique - yohimbine.
5. Ajmaline - ajmaline déshydratée - dérivés acétylés de l'ajmaline.
6. Yohimbine - acétylyohimbine.
7. 1ère dimension = acide réserpique - réserpate de méthyle - rescinnamine.
   2ème dimension = acide triméthoxycinnamique - son produit de transformation (révélation par $KMnO_4$).

2) APPLICATION DES TRANSFORMATIONS FONCTIONNELLES AUX PRÉPARATIONS PHARMACEUTIQUES.

a) Comprimés contenant un alcaloïde des Rauwolfia :

Les différentes transformations fonctionnelles sont applicables sur l'extrait éthanolique des comprimés : on épuise les comprimés pulvérisés par l'alcool à 95° et on concentre la solution alcoolique au bain-marie; pour des comprimés à concentration suffisante en alcaloïdes, l'épuisement des comprimés pulvérisés par l'alcool peut se faire dans le tube effilé même, qui sert à déposer l'alcaloïde sur la chromatoplaque. S'il s'agit de comprimés dragéifiés colorés, l'extraction par l'alcool est précédée d'un lavage de l'enrobage par l'eau.

b) Comprimés ou solutés injectables contenant les alcaloïdes totaux des Rauwolfia :

Quoique plus difficilement, les transformations fonctionnelles restent applicables, en particulier la différenciation réserpine - rescinnamine.

Première application : mélange réserpine - rescinnamine - ajmaline - yohimbine.

Deuxième application : comprimés avec les alcaloïdes totaux de Rauwolfia serpentina.

Conclusions.

La CFCM s'applique difficilement aux alcaloïdes totaux des Rauwolfia, du fait que ces extraits d'alcaloïdes totaux étudiés, présentaient un minimum de sept spots avant transformation fonctionnelle. Par contre, la CFCM permet de renforcer la caractérisation de l'ajmaline par acétylation, celle de la yohimbine par acétylation et par saponification. Elle permet surtout de mettre en évidence réserpine ou rescinnamine dans un mélange complexe par l'action de la chaleur ou par saponification, puis de différencier les deux alcaloïdes par la différence de comportement en chromatographie sur couche mince, des acides triméthoxybenzoïque et triméthoxycinnamique.

Chapitre VII

CAFÉINE

A - TRAVAUX ANTÉRIEURS.

Dans ce domaine, les travaux antérieurs en CCM avaient surtout en vue la séparation caféine-théobromine-théophylline. Les meilleures séparations ont été obtenues soit sur plaques de silice rendues basiques en développant avec des systèmes solvants neutres, soit sur plaques de silice neutres en effectuant le développement avec des systèmes solvants basiques. La séparation est également satisfaisante sur silice neutre avec des systèmes sovants acides.

Dès 1960, TEICHERT et coll. (118) séparent les 3 bases puriques avec le mélange chloroforme-éthanol à 96 % 9-1 sur plaques de kieselgel G tamponnées à pH 6,8.

En 1963, ŠARŠÚNOVÁ et SCHWARZ (102) optent pour l'alumine sans liant avec les systèmes solvants benzène-éthanol absolu 4-1 et 7-3. La même année, SZASZ et coll. (116) utilisent également la CCM pour séparer caféine, théobromine et théophylline.

En 1964, ZARNACK et coll. (133) font le point sur la CCM des purines; ils préconisent le développement avec le mélange acétone-chloroforme-n-butanol-ammoniaque à 25 % 30-30-40-10 sur plaques de kieselgel G.

L'année suivante, SCHUNACK et coll. (107) mettent au point une méthode de chromatographie bidimensionnelle sur gel de silice GF 254 en vue de la séparation de 13 bases xanthiques; pour le développement, ils utilisent successivement les mélanges benzène-acétone 30-70 en atmosphère d'ammoniaque et chloroforme-éthanol-acide formique 88-10-2.

En 1966, RINK et GEHL (97) obtiennent une bonne séparation de 8 bases xanthiques en imprégnant le gel de silice GF 254 par une solution de pipérazine et en développant à l'aide du mélange isopropanol-chloroforme-solution aqueuse de pipérazine à 10 % 60-20-20. La même année SZENDEY (117), sans modifier l'adsorbant précédent, utilise le système chloroforme-acétone-méthanol 30-30-30.

FINCKE (22) s'est adressé à la CCM pour caractériser la caféine et la théobromine dans les graisses de cacao, alors que GÄNSHIRT (26), séparait ces bases puriques sur kieselgel G par le mélange cyclohexane-acétone 40-50, avant de les doser par spectrophotométrie.

Très récemment, SENANAYAKE et WIJESEKERA (109 bis) séparent caféine, théobromine et théophylline sur plaques de kieselgel G à l'aide du mélange chloroforme-tétrachlorure de carbone-méthanol 8-5-1 et dosent ces substances par évaluation densitométrique des taches ou, après élution, par spectrophotométrie.

NÉTIEN et coll. (67) caractérisent par CCM la caféine dans différentes préparations galéniques en utilisant des plaques de kieselgel G avec le solvant méthanol-acétate d'éthyle-acide chlorhydrique 70-10-20.

Les bases puriques peuvent être révélées en CCM par différentes méthodes : les vapeurs d'iode ou une solution d'iode, préconisées par SCHUNACK et coll. (107); la chloration, suivie de l'application d'une solution pyridinique de 1-phényl-3-méthyl pyrazolone-5 (113); pour révéler des quantités plus grandes de dérivés puriques, BAEHLER (3) préconise de sublimer les bases puriques sur une plaque de verre réfrigérée.

B - TRAVAUX PERSONNELS.

1) TRANSFORMATIONS FONCTIONNELLES.

Les différentes méthodes de révélation de la caféine étant peu sensibles, nous avons mis au point, pour son identification, une transformation fonctionnelle sur chromatoplaque qui constitue une variante de la réaction de la murexide (46).

a) Principe de la réaction :

La caféine est oxydée par l'eau de brome en tube capillaire; il se forme un produit de coloration jaune orangé que l'on dépose sur une chromatoplaque. Par action des vapeurs d'ammoniaque ou de diéthylamine, le spot jaune orangé vire au mauve. On complète la caractérisation du spot mauve en développant la chromatoplaque et en mesurant le R_F du produit coloré.

b) Technique :

La caféine, en solution à 1 % dans HCl N, est traitée en tube capillaire par de l'eau saturée de brome pendant 30 minutes à 80°C à l'étuve. Après application du mélange réactionnel au point d'application d'une chromatoplaque, on chasse l'eau de brome et l'acide chlorhydrique par chauffage de la chromatoplaque à 140°C pendant 30 minutes; on obtient ainsi un résidu jaune orangé. On procède ensuite au développement dans le système solvant cyclohexane-chloroforme-diéthylamine 3-6-1; au contact de la diéthylamine du solvant, le spot jaune orangé vire au mauve; après un développement de 10 cm, le spot mauve présente un R_F de 0,15 (caféine : R_F = 0,42).

c) Sensibilité :

Le seuil de sensibilité pour la caféine est de 10 µg.

d) Spécificité :

La transformation fonctionnelle est spécifique des bases puriques, mais la théophylline et la théobromine donnent le spot mauve de même R_F que la caféine.

2) APPLICATION DE LA TRANSFORMATION FONCTIONNELLE AUX PRÉPARATIONS PHARMACEUTIQUES.

a) Teinture et extrait fluide de Kola :

Comme la transformation fonctionnelle préconisée n'a pu être appliquée directement à la teinture (0,25 % de caféine) ou à l'extrait fluide (1,25 % de caféine), nous avons extrait la caféine par chromatographie sur colonne.

Sur une colonne d'alumine (5 g), on verse 1 ml de teinture (ou 0,2 ml d'extrait fluide), puis on élue la caféine par environ 20 ml de chloroforme. Le résidu d'évaporation du chloroforme est mis en solution dans HCl N, de façon à obtenir une solution contenant environ 1 % de caféine.

b) Saccharure granulé de Kola (0,6 % de caféine) :

Nous avons extrait la caféine à partir du saccharure granulé par la technique que nous préconisons dans la cinquième partie de notre travail (voir page 114). Puis la caféine extraite est dissoute dans HCl N en vue de la réaction de la murexide modifiée.

C I N Q U I È M E P A R T I E

ANALYSE DES SIROPS ET DES SACCHARURES GRANULÉS CONTENANT DES ALCALOÏDES PAR MÉLANGE AVEC UN ADSORBANT CHROMATOGRAPHIQUE

P L A N

A - INTRODUCTION.

B - ANALYSE DES SIROPS.

1) Technique générale.

2) Applications.

a) Sirop d'Ipécacuanha.
b) Sirop d'Ipécacuanha composé.
c) Sirop d'opium fort.
d) Sirop de codéine-émétine.
e) Sirop de bromoforme-codéine.
f) Sirop de pholcodine.
g) Sirop de Belladone.
h) Sirop atropo-thébaïque.

C - ANALYSE DES SACCHARURES GRANULÉS.

1) Technique générale.

2) Applications.

a) Saccharure granulé de Kola.
b) Saccharure granulé de charbon benzonaphtolé belladoné.

D - ANALYSE DES OENOLÉS.

ANALYSE DES SIROPS ET DES SACCHARURES GRANULÉS CONTENANT DES ALCALOÏDES PAR MÉLANGE AVEC UN ADSORBANT CHROMATOGRAPHIQUE

A - INTRODUCTION.

L'identification et le dosage des principes actifs ou des adjuvants, présents en faible quantité dans les préparations pharmaceutiques, posent souvent à l'analyste des difficultés d'extraction préalable, en particulier pour les préparations riches en sucre (sirops, saccharures granulés) ou à consistance pâteuse (pommades, suppositoires). Pour faciliter l'isolement de ces composants, nous préconisons le mélange de la préparation pharmaceutique avec un adsorbant pour chromatographie tel que l'alumine, suivi de l'élution sélective des substances à identifier par des solvants appropriés dans une colonne chromatographique. Cette méthode, déjà utilisée par différents auteurs pour le dosage de certaines drogues (86, 87, 28), n'a pas été appliquée à notre connaissance, aux préparations pharmaceutiques telles que sirops, saccharures granulés.

Les méthodes d'extraction par solvants, classiquement utilisées, présentent plusieurs inconvénients :

- Elles nécessitent souvent des agitations longues et répétées de la préparation pharmaceutique avec les solvants d'extraction.

- Il se forme fréquemment des émulsions difficiles à détruire entre les deux phases liquides lors de l'extraction.

- Certains alcaloïdes sont extraits difficilement soit par suite de leur faible solubilité dans la phase organique (morphine, strychnine par exemple), soit par suite de leur solubilité relativement élevée dans la phase aqueuse.

Avec la méthode que nous préconisons, ces inconvénients disparaissent en grande partie, comme le prouvent les exemples qui suivent, choisis dans la Pharmacopée française (Codex 1949 et 1965) et dans le Formulaire National Pharmaceutique (23). En effet, le plus souvent, les alcaloïdes sont adsorbés sur l'alumine, puis éluables par l'éther ou le chloroforme, alors que les adjuvants tels que le sucre, les conservateurs ne sont pas éluables en général dans ces conditions. Sur le résidu d'évaporation de l'éluat, la caractérisation des alcaloïdes est obtenue par leur R_F en chromatographie sur couche mince (CCM) ou, d'une façon plus spécifique, par la chromatographie fonctionnelle sur couche mince (CFCM) qui a été l'objet de notre étude.

B - ANALYSE DES SIROPS.

1) TECHNIQUE GÉNÉRALE.

On triture au mortier 1 partie de sirop avec 5 parties d'alumine Merck, ce qui donne une poudre grumeleuse par l'eau du sirop. Le mélange est abandonné pendant quelques heures à l'air ou séché pendant 30 minutes à l'étuve à 105°C, si le principe actif supporte ce chauffage. Le produit pulvérulent obtenu est introduit dans une colonne chromatographique (diamètre : 0,5 - 1 cm).

- Si le sirop contient des composants éluables à l'éther de pétrole ou de benzène (par ex. huiles essentielles, résines), on commence par leur élution à l'aide de ces solvants; pour éviter toute perte de principes volatils, cette élution peut éventuellement se faire avant dessiccation de la poudre.

- La colonne d'alumine est ensuite traitée à l'éther ou au chloroforme qui éluent la plupart des alcaloïdes (pas la morphine par ex.); l'éluat alcaloïdique est évaporé à sec au bain-marie. Le résidu d'évaporation est analysé par chromatographie sur couche mince, en opérant sur des plaques de kieselgel G (e = 0,25 mm) avec le système chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1 pour le développement et les réactifs iodobismuthique et iodoplatinique pour la révélation.

2) APPLICATIONS.

a) Sirop d'Ipécacuanha (Codex 1949) :

On mélange 1 g de sirop (= environ 400 µg d'émétine et 300 µg d'autres alcaloïdes) avec 5 g d'alumine, puis on élue par 20 ml de chloroforme. Sur le résidu, émétine et céphéline peuvent être caractérisées par leurs R_F en CCM (respectivement 0,70 et 0,43) et par leurs dérivés colorés obtenus en CFCM par action de l'acétate mercurique en tube capillaire (voir page 82).

b) Sirop d'Ipécacuanha composé : sirop de Desessartz (Codex 1965) :

On mélange 5 g de sirop (= environ 100 µg d'émétine) avec 15 g d'alumine, puis on élue par 30 ml de chloroforme. Sur le résidu, on peut caractériser l'émétine et la céphéline par leur R_F en CCM.

c) Sirop d'opium fort (Codex 1965) :

On mélange 1 g de sirop (= 500 µg de morphine) avec 5 g d'alumine, puis on élue par 20 ml de chloroforme. Dans ces con-

ditions, la morphine, retenue sur la colonne, ne se retrouve pas en CCM; par contre, on observe les spots correspondant à la codéine, la thébaïne, la papavérine et la noscapine (R_F respectifs : 0,38 ; 0,64 ; 0,67 ; 0,73) (voir page 77).

N.B. - L'utilisation d'un éluant plus polaire ou d'un adsorbant différant n'a pas donné une élution sélective satisfaisante de la morphine.

d) Sirop de codéine-émétine (sirop spécialisé contenant pour 100 g : 25 mg d'extrait total d'opium; 25 mg de codéine (chlorhydrate); 4,5 mg d'émétine (chlorhydrate); 1,5 mg de céphéline (chlorhydrate) :

2 g de sirop sont mélangés avec 5 g d'alumine; l'élution se fait avec 30 ml de chloroforme. La CCM permet de mettre en évidence les spots de la codéine, de la papavérine, de l'émétine et de la céphéline (R_F respectifs : 0,38 ; 0,67 ; 0,70 ; 0,43).

e) Sirop de bromoforme-codéine (23) :

On mélange 5 ml de sirop (5 mg de codéine, 25 mg de bromoforme, 2,5 mg d'eucalyptol et 0,5 mg de menthol) avec 15 g d'alumine.

- L'élution avec 40 ml d'éther de pétrole permet l'isolement de l'eucalyptol et du menthol que l'on caractérise par CCM avec le benzène pour le développement et le trichlorure d'antimoine pour la révélation.

- Puis l'élution avec 40 ml de chloroforme donne la codéine que l'on caractérise par son R_F (0,38) et éventuellement par ses transformations fonctionnelles (voir page 74).

f) Sirop de pholcodine à 1 p.1000 :

On mélange 1 g de sirop avec 5 g d'alumine et on élue par 20 ml de chloroforme.

La pholcodine est identifiable par son R_F (0,35) en CCM et par ses transformations fonctionnelles en CFCM (voir page 74).

g) Sirop de Belladone (Codex 1949) :

10 g de sirop (= 150 µg d'alcaloïdes totaux) sont mélangés avec 30 g d'alumine; après dessiccation, on ajoute 150 mg de charbon activé pour adsorber la chlorophylle et on élue par 100 ml de chloroforme. Par CCM sur le résidu, on caractérise l'atropine (R_F 0,37) (voir page 54).

h) Sirop atropo-thébaïque (18) :

On mélange 5 g de sirop (= environ 8 mg d'extrait d'opium et 5,5 mg d'extrait de Belladone) avec 15 g d'alumine et on élue par 50 ml de chloroforme. La CCM permet de mettre en évidence :

- nettement codéine, papavérine, atropine ;
- moins bien, noscapine et thébaïne.

La morphine est retenue sur la colonne d'alumine.

C - ANALYSE DES SACCHARURES GRANULÉS.

1) TECHNIQUE GÉNÉRALE.

Au mortier, l'on triture 1 partie de granulé avec 10 à 50 parties d'alumine Merck en présence d'un peu d'eau, de façon à obtenir une adsorption homogène. On laisse sécher à l'air pendant 30 minutes à 1 heure. Puis on procède à l'élution dans une colonne chromatographique et à l'identification des alcaloïdes par CCM comme pour les sirops.

2) APPLICATIONS.

a) Saccharure granulé de Kola (Codex 1949) :

Mélanger 100 mg de granulé (600 µg de caféine) avec 5 g d'alumine en présence de 0,5 ml d'eau et éluer par 20 à 30 ml de chloroforme. La caféine peut être caractérisée par son R_F en CCM (environ 0,65) et éventuellement en CFCM par la réaction de la murexide modifiée (voir page 105).

N.B. - D'après nos essais, l'extraction de la caféine par cette technique paraît être quantitative, de sorte qu'on peut envisager ainsi le dosage de la caféine dans le saccharure granulé.

b) Saccharure granulé de charbon benzonaphtolé belladoné (23):

On mélange 2 g de granulé (= 2 mg d'extrait de Belladone ou 50 µg d'alcaloïdes totaux, 20 mg de benzonaphtol et 2 g de charbon végétal activé) avec 13 g d'alumine en présence d'un peu d'eau, puis on élue par 50 ml de chloroforme. Sur le résidu, l'atropine est caractérisée par son R_F (0,37), le benzonaphtol par sa coloration brun clair (après exposition de la plaque à 100°C) et son R_F (voisin de 0,30).

D - ANALYSE DES OENOLÉS.

La technique que nous préconisons s'est avérée utile également pour la caractérisation dans un oenolé, des alcaloïdes des Quinquinas et de la strychnine.

On mélange au mortier 2 ml de l'oenolé (= 34 µg de sulfate de strychnine, 360 µg de quinine et 50 mg d'écorce de Quinquina jaune) avec 5 g d'alumine; après dessiccation à l'air libre pendant quelques heures, on élue par 20 ml de chloroforme dans une colonne chromatographique. Sur le résidu, l'on peut caractériser la strychnine et les alcaloïdes des Quinquinas par leurs R_F en CCM.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

De conception plus récente, la chromatographie sur couche mince est devenue, au même titre que la chromatographie sur papier, une technique courante d'identification des composants des préparations pharmaceutiques. Cependant, la difficulté de reproduire un R_F chromatographique qui dépend de trop nombreux facteurs expérimentaux, ne permet pas de lui attribuer, dans la pratique journalière, une valeur absolue comme par exemple celle d'un point de fusion. La chromatographie fonctionnelle sur couche mince que nous préconisons dans notre travail et dont nous montrons l'intérêt par son application aux alcaloïdes, lève l'objection de la reproductibilité du R_F. En effectuant sur un alcaloïde une microréaction chimique au point d'application de la chromatoplaque, nous caractérisons cet alcaloïde non seulement par son R_F, mais en même temps par le R_F de son produit de transformation et par sa réactivité chimique vis-à-vis du réactif utilisé. La chromatographie fonctionnelle sur couche mince assure donc une spécificité d'identification quasi absolue par la comparaison, avec un témoin, de deux valeurs de R_F et du comportement vis-à-vis d'un réactif. En même temps, elle conserve la grande sensibilité de la chromatographie sur couche mince, puisque les transformations fonctionnelles que nous proposons, nécessitent 5 à 50 µg de produit.

Dans notre travail de thèse, nous avons sélectionné, parmi de nombreuses réactions essayées, celles qui présentent un intérêt dans l'identification des alcaloïdes étudiés. A la fin de chaque chapitre de la quatrième partie, nous avons exposé les conclusions concernant les transformations fonctionnelles retenues pour les différents groupes d'alcaloïdes. Pour l'application de ces transformations fonctionnelles, nous avons standardisé le développement sur plaques de kieselgel G en donnant les R_F des alcaloïdes étudiés et de leurs produits de transformation dans le système solvant chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1, déjà utilisé par WALDI et en préconisant, pour la séparation de chaque groupe d'alcaloïdes, un ou plusieurs systèmes solvants spéciaux. Les valeurs de R_F que nous avons déterminées pour les différents groupes d'alcaloïdes sont rassemblées dans des tableaux.

La troisième partie de notre travail est consacrée aux méthodes d'extraction que nous avons utilisées pour isoler les alcaloïdes à partir des préparations pharmaceutiques, en vue de leur caractérisation par chromatographie fonctionnelle sur couche mince. En général, les méthodes indiquées ne donnent pas une extraction quantitative, mais elles sont simples et rapides à l'emploi. Pour extraire les alcaloïdes des teintures et extraits

de feuilles, nous avons mis au point une technique de chromatographie sur colonne d'alumine, contenant une proportion de charbon activé, calculée de façon à adsorber la chlorophylle à l'exclusion des alcaloïdes.

Dans une prochaine édition de la Pharmacopée française, il nous paraîtrait utile d'introduire pour les alcaloïdes et les préparations galéniques qui en contiennent, un système solvant "universel" avec l'indication des R_F des alcaloïdes, obtenus dans des conditions bien définies et celle de quelques transformations fonctionnelles simples :

- Action de la chaleur pour l'atropine, la scopolamine et la réserpine.
- Acétylation de la morphine et de la codéine pour les différencier des autres alcaloïdes de l'opium, de la céphéline pour la différencier de l'émétine, de l'ajmaline et de la yohimbine pour les différencier des alcaloïdes des Rauwolfia sans groupements -OH.
- Saponification pour l'atropine et la scopolamine.
- Réaction de Denigès modifiée (borohydrure de sodium) et acide nitrique pour les alcaloïdes de la noix vomique.
- Réaction de la murexide modifiée pour la caféine.

Ainsi la caractérisation de l'atropine pourrait se faire de la façon suivante :

Adsorbant : kieselgel G; système solvant : chloroforme-acétone-diéthylamine 5-4-1; révélateur : réactif iodoplatinique ou iodobismuthique.

Atropine : R_F = 0,37; après 1 heure à 120°C : R_F = 0,52 (apoatropine).

La chromatographie fonctionnelle sur couche mince que nous avons appliquée dans notre travail aux alcaloïdes, pourrait également servir à identifier d'autres groupes de médicaments (par exemple : stéroïdes, antibiotiques).

En outre, la chromatographie fonctionnelle sur couche mince devrait aussi trouver des applications en chimie analytique organique comme microméthode d'analyse fonctionnelle et en toxicologie, où l'on dispose généralement de peu de produit, pour la certitude d'identification obtenue et la sensibilité des réactions.

Dans la dernière partie de notre travail, nous décrivons une méthode de chromatographie sur colonne que nous avons mise au point en vue de l'isolement des alcaloïdes à partir des préparations pharmaceutiques à base de saccharose (sirops et saccharures granulés). Cette technique consiste à mélanger la préparation directement avec un adsorbant chromatographique tel que l'a-

lumine, puis à éluer les alcaloïdes dans une colonne par un solvant organique tel que le chloroforme. Par rapport à la méthode d'extraction par un système liquide biphasique, celle que nous proposons présente des avantages notables : dans les cas que nous détaillons, elle est plus rapide, nécessite une prise d'essai moindre, donne une meilleure extraction des alcaloïdes. Dans le cas du saccharure granulé de kola, l'extraction de la caféine s'est même avérée quantitative avec un minimum de solvant éluant. La méthode que nous proposons devrait donc faciliter l'analyse des sirops et des saccharures granulés contenant des alcaloïdes et il serait intéressant de chercher à étendre son application à d'autres catégories de médicaments. C'est ainsi que dans le laboratoire de pharmacie galénique où a été effectué ce travail, elle a déjà permis l'extraction quantitative de quelques antibiotiques à partir de sirops spécialisés.

B I B L I O G R A P H I E

(1) - ADAMSKI (R.), LUTOMSKI (J.) et WISNIEWSKI (J.) - Dtsch. Apotheker-Ztg., 1967, 107, 185.

(2) - AZARNOFF (D.L.) et TUCKER (D.R.) - Biochim. biophys. Acta, 1963, 70, 589; C.A., 1964, 60, 4412 c.

(3) - BAEHLER (B.) - Helv. chim. Acta, 1962, 45, 309.

(4) - BATTERSBY (A.R.) et OPENSHAW (H.T.) - J. chem. Soc., 1949, 67.

(5) - BAÜMLER (J.) et RIPPSTEIN (S.) - Pharm. Acta Helv. 1961, 36, 382.

(6) - BAYER (I.) - J. Chromatog., 1964, 16, 237.

(7) - BÖHME (H.), BERG (G.), STAMM (H.) et TAUBER (E.) - Arch. Pharm., 1961, 447.

(8) - BORIO (B.L.) et MOREIRA (E.A.) - Tribuna farmaceutica, 1964, 64.

(9) - BÜCHI (J.) et ZIMMERMANN (A.) - Pharm. Acta Helv. 1965, 40, 292, 361, 395.

(10) - CAGGIANO (E.) et MARINI-BETTÒLO (G.B.) - Rend. Ist. sup. Sanità, 1962, 25, 375; C.A., 1963, 58, 12.847 h.

(11) - CARGILL (D.I.) - Analyst, 1962, 87, 865; C.A., 1963, 58, 5969 g.

(12) - CHICHIRO (V.E.) - Aptechn. Delo, Moscou, 1963, 12, 36 ; C.A., 1964, 61, 10.534 e.

(13) - COCHIN (J.) et DALY (J.W.) - Experientia, 1962, 18, 294.

(14) - CONSDEN (R.), GORDON (A.H.) et MARTIN (A.J.P.) - Biochem. J., 1944, 38, 224.

(15) - DÁNOS (B.) - Acta Pharm. Hung., 1964, 34, 221 ; C.A., 1964, 61, 16.433 g.

(16) - DEMOLE (E.) - J. Chromatog., 1958, 1, 24.

(17) - DEMOLE (E.) et LEDERER (E.) - Bull.Soc.Chim.Fr., 1958,1128.

(18) - DORVAULT - La Nouvelle Officine, Vigot Ed., Paris, 1955, 2, 1399.

(19) - DRAGENDORFF (G.) - Manuel de Toxicologie, (traduit par RITTER (E.), Savy Ed., Paris, 1875.

(20) - DRYON (L.) - J. Pharm. Belg., 1964, 19, 19.

(21) - FAIRBAIRN (J.W.) et EL-MASRY (S.) - J. Pharm. Pharmacol., 1967, 19, Suppl. 95 S.

(22) - FINCKE (A.) - Fette, Seifen, Austrichmittel, 1963, 65, 647; C.A., 1964, 60, 3205 a.

(23) - Formulaire de la Fédération Nationale Pharmaceutique, S.U.T.I.P., Paris, 1965.

(24) - FROHNE (D.) - Dtsch. Apotheker-Ztg., 1964, 104, 1404.

(25) - FUMAGILLI (U.), AMBROGI (V.) et BALESTRA (G.) - Boll. Chim. Farm., 1964, 103, 911.

(26) - GÄNSHIRT (H.) - Arch. Pharm., 1963, 296, 129.

(27) - GRAF (E.) - Pharmazie, 1965, 20, 331.

(28) - GRANDOLINI (E.), GALEFFI (C.), MONTALVO (E.),CASINOVI (C.G.) et MARINI-BETTÒLO (G.B.) - dans MARINI-BETTÒLO, Thin-Layer Chromatography, Elsevier Ed., Amsterdam, 1964, 155.

(29) - GREEN (J.) et MARCINKIEWICZ (S.) - J. Chromatog., 1963, 10, 35.

(30) - GROSS (D.) et SCHÜTTE (H.R.) - Arch. Pharm., 1963, 296, 1.

(31) - HERMANEK (S.), SCHWARZ (W.) et ČEKAN (Z.) - Pharmazie, 1961, 16, 566.

(32) - HEUSSER (D.) - Planta med., 1964, 12, 237.

(33) - HEUSSER (D.) et JACKWERTH (E.) - Dtsch. Apotheker-Ztg., 1965, 105, 107.

(34) - HUANG (J.T.), HSIU (H.C.) et WANG (K.T.) - J. Chromatog., 1967, 29, 391.

(35) - IKRAM (M.) et BAKHSH (M.K.) - Anal. Chem., 1964, 36, 111.

(36) - IKRAM (M.), MIANA (G.A.) et ISLAM (M.) - J. Chromatog., 1963, 11, 260.

(37) - ISMAILOV (N.A.I.) et SCHRAIBER (M.S.) - Farmatsiya, 1938, 3, 1.

(38) - KAISER (H.), BIEDEBACH (F.) et MANNS (G.) - Pharm. Ztg., 1963, 108, 1380; C.A., 1965, 63, 11.253 f.

(39) - KAMP (W.), ONDERBERG (W.J.M.) et VAN SETERS (W.A.) - Pharm. Weekblad, 1963, 98, 993; C.A., 1964, 61, 1707 c.

(40) - KAUFMANN (H.P.), MAKUS (Z.) et KHOE (T.H.) - Fette, Seifen, Austrichmittel, 1962, 64, 1; C.A., 1962, 57, 2356 h.

(41) - KHANNA (K.L.), SCHWARTING (A.E.), ROTHER (A.) et BOBBIT (J.M.) - Lloydia, 1961, 23, 179; C.A., 1962, 56, 10.282 b.

(42) - KIRCHNER (J.G.), MILLER (J.M.) et KELLER (G.E.) - Anal. Chem., 1951, 23, 420.

(43) - KLEIN (E.), ROJAHN (W.) et HENNEBERG (D.) - Tetrahedron, 1964, 20, 2025.

(44) - KOFOED (J.), FABIERKIEWICZ (C.) et LUCAS (G.H.W.) - J. Chromatog., 1966, 23, 410.

(45) - LEAL (M.M.), DO ROSARIO (R.H.) et RALHA (A.J.C.) - Rev. Portug. Farm., 1964, 14, 256; C.A., 1966, 64, 4868 c.

(46) - LEBEAU (P.) et JANOT (M.-M.) - Traité de Pharmacie Chimique, Masson Ed., 4e éd. 1955-56, 4, 2754-98.

(47) - LEDERER (E.) - Scan. J. Clin. Lab. Invest., 1957, 10, suppl. 31, 89.

(48) - LISBOA (B.P.) et DICZFALUSY (E.) - Acta Endocrinol., 1962, 40, 60.

(49) - LIST (P.H.), HANAFI (S.) et STEIN (E.) - Dtsch. Apotheker-Ztg., 1963, 103, 1314.

(50) - LUCKNER (M.), BESSLER (O.) et LUCKNER (R.) - Pharm. Zentralhalle, 1966, 105, 711.

(51) - LUCKNER (M.), WINCKLER (K.), BESSLER (O.), HOFFMANN (J.) et POETHKE (W.) - Pharm. Zentralhalle, 1964, 103, 484.

(52) - MACHATA (G.) - Mikrochim. Acta, 1960, 79.

(53) - MACHOVIČOVÁ (F.) et PARRÁK (V.) - Československ. Farm., 1964, 13, 200; C.A., 1964, 61, 9.363 c.

(54) - MANSKE (R.H.F.) et HOLMES (H.L.) - The alkaloïds chemistry and physiology, Academic Press (Londres), tome 2, 426.

(55) - - Id. - tome 7, 117.

(56) - MATHIS (C.) - Étude chimio-taxonomique du genre Hypericum, Thèse Doct. Sci., Strasbourg, 1963.

(57) - MATHIS (C.) - Ann. pharm. fr., 1965, 23, 331.

(58) - MATHIS (C.) et OURISSON (G.) - J. Chromatog., 1963, 12, 94.

(59) - MATHIS (C.) et OURISSON (G.) - Phytochemistry, 1964, 3, 115 et 133.

(60) - MEINHARD (J.E.) et HALL (N.F.) - Anal. Chem., 1949, 21, 185.

(61) - MILLER (J.M.) et KIRCHNER (J.G.) - Anal. Chem., 1953, 25, 1107.

(62) - MOTTIER (M.) et POTTERAT (M.) - Anal. Chim. Acta, 1955, 13, 46.

(63) - MOTTIER (M.) et POTTERAT (M.) - Lebensmittel untersuch. Hygiene, 1956, 47, 372.

(64) - MULÉ (S.J.) - Anal. Chem., 1964, 36, 1907.

(65) - MUNIER (R.) et MACHEBOEUF (M.) - Bull. Soc. Chim. biol., 1949, 31, 1144.

(66) - MUNIER (R.) et MACHEBOEUF (M.) - C.R. Acad. Sci., 1950, 230, 1177.

(67) - NÉTIEN (M.G.), Mlle PRUM et PRUM (M.) - Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon, 1966, 10, 39.

(68) - NEUBAUER (D.) et MOTHES (K.) - Planta med., 1961, 9, 466.

(69) - NEUMANN (D.) et SCHRÖTTER (H.B.) - J. Chromatog., 1964, 16, 414.

(70) - NONCLERCQ (M.) et NYS (C.) - J. Pharm. Belg., 1964, n°9-10, 421.

(71) - OSWALD (N.) et FLÜCK (H.) - Sci. Pharm., 1964, 32, 136.

(72) - OSWALD (N.) et FLÜCK (H.) - Pharm. Acta Helv., 1964,39,293.

(73) - PARIS (R.) et FAUGERAS (G.) - Ann. pharm. fr., 1966,24,613.

(74) - PARIS (R.) et PARIS (M.) - Bull. Soc. Chim. Fr., 1963, 1597.

(75) - PARRÁK (V.), RADĚJOVÁ (E.) et MACHOVIČOVÁ (F.) - Chem. Zvesti, 1964, 18, 369; C.A., 1964, 61, 9363 e.

(76) - PATEL (M.B.), POISSON (J.), POUSSET (J.L.) et ROWSON (J.M.)- J. Pharm. Pharmacol., 1965, 17, 323.

(77) - PESNELLE (P.), TEISSEIRE (P.) et WICHTL (M.) - Planta med., 1964, 12, 403; C.A., 1965, 62, 12.070 g.

(78) - PFEIFFER (S.) - J. Chromatog., 1966, 24, 364.

(79) - PINXTEREN (J.A.C. Van) et VERLOOP (M.E.) - Pharm. Weekblad, 1962, 97, 1.

(80) - PINXTEREN (J.A.C. Van) et VERLOOP (M.E.) - Pharm. Acta Helv., 1963, 38, 437.

(81) - POETHKE (W.) et HOFFMANN (J.) - Pharm. Zentralhalle, 1964, 103, 731.

(82) - POETHKE (W.) et HOFFMANN (J.) - Pharm. Zentralhalle, 1965, 104, 559.

(83) - POETHKE (W.) et KINZE (W.) - Pharm. Zentralhalle, 1962, 101, 685.

(84) - POETHKE (W.) et KINZE (W.) - Pharm. Zentralhalle, 1963, 102, 692.

(85) - POETHKE (W.) et KINZE (W.) - Pharm. Zentralhalle, 1964, 103, 577.

(86) - POETHKE (W.) et KINZE (W.) - Arch. Pharm., 1964, 297, 593.

(87) - POETHKE (W.) et KINZE (W.) - Pharm. Zentralhalle, 1965, 104, 489.

(88) - PÖTTER (H.) et VOIGT (R.) - Pharmazie, 1966, 21, 291.

(89) - PÖTTER (H.) et VOIGT (R.) - Pharmazie, 1967, 22, 198.

(90) - PREININGER (V.), VRUBLOUSKY (P.) et ŠTASTNY (V.) - Pharmazie, 1965, 20, 439.

(91) - QUIRIN (M.), LÉVY (J.) et LE MEN (J.) - Ann. pharm. fr., 1965, 23, 93.

(92) - RAGAZZI (E.), VERONESE (G.) et GIACOBAZZI (C.) - dans MARINI-BETTÒLO, Thin-Layer Chromatography, 1964, 149.

(93) - RAMAUT (J.L.) - Bull. Soc. Chim. belg., 1963, 72, 406.

(94) - REITSEMA (R.H.) - Anal. Chem., 1954, 26, 960.

(95) - RIEHL (J.) et REICH (G.) - Dtsch. Apotheker-Ztg., 1967, 107, 1406.

(96) - RIESS (J.) - J. Chromatog., 1965, 19, 527.

(97) - RINK (M.) et GEHL (A.) - J. Chromatog., 1966, 21, 143.

(98) - ROBLES (M.A.) et WIENTJES (R.) - Pharm. Weekblad, 1961, 96, 379.

(99) - ROUSSELET (R.) - De l'essai des médicaments à alcaloïdes, Thèse Doct. Pharm., André Lesot Ed., Paris, 1963.

(100) - RUSIECKI (W.) et HENNEBERG (M.) - Ann. pharm. fr., 1963, 21, 843.

(101) - SAHLI (M.) - Arzneimittel-Forsch., 1962, 12, 55.

(102) - ŠARŠÚNOVÁ (M.) et SCHWARZ (V.) - Pharmazie, 1963, 18, 207; C.A., 1963, 59, 1441 a.

(103) - ŠARŠÚNOVÁ (M.), TÖLGYESSY (J.) et HRADIL (M.) - Pharmazie, 1964, 19, n° 5.

(104) - SCHILCHER (H.) - Dtsch. Apotheker-Ztg., 1965, 105, 1067.

(105) - SCHLEMMER (F.) et LINK (E.) - Pharm. Ztg., 1959, 104, 1349.

(106) - SCHNECKENBURGER (J.) et HARTIKAINEN (I.) - Dtsch. Apotheker-Ztg., 1964, 104, 1402.

(107) - SCHUNACK (W.), MUTSCHLER (E.) et ROCHELMEYER (H.) - Dtsch. Apotheker-Ztg., 1965, 105, 1551.

(108) - SCHWARZ (V.) et ŠARŠÚNOVÁ (M.) - Pharmazie, 1964, 19, 267.

(109) - SELMI (F.) - Mem. della Accad. di Bologna, 1874, 6, 3.

(109 bis) - SENANAYAKE (U.M.) et WIJESEKERA (R.O.B.) - J. Chromatog., 1968, 32, 75.

(110) - STAHL (E.) - Chemiker Ztg., 1958, 82, 323.

(111) - STAHL (E.) in PAECH (K.) et TRACEY (M.V.) - Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Springer Verlag, Berlin, tome 5.

(112) - STAHL (E.) - Chem. Ingr. Techn., 1964, 36, 941.

(113) - STAHL (E.) - Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag, Berlin, 2e éd., 1967.

(114) - STEELE (J.A.) - J. Chromatog., 1965, 19, 300.

(115) - SZABÓ (E.), LÖRINCZ (K.) et HÉTHELYI (É.) - Herba Hung., 1964, 3, 105.

(116) - SZASZ (G.), SZASZ-ZACSKO (M.) et POLANKAY (V.) - Acta Pharm. Hung., 1965, 35, 207; C.A., 1965, 63, 14.637 f.

(117) - SZENDEY (G.L.) - Arch. Pharm., 1966, 299, 527.

(118) - TEICHERT (K.), MUTSCHER (E.) et ROCHELMEYER (H.) - Dtsch. Apotheker-Ztg., 1960, 100, 283 et 477.

(119) - TEICHERT (K.), MUTSCHER (E.) et ROCHELMEYER (H.) - Z. Anal. Chem., 1961, 181, 325.

(120) - TSCHESCHE (R.), KOMETANI (K.), KOWITZ (F.) et SNATZKE (G.)- Chem. Ber., 1961, 94, 3327.

(121) - ULLMANN (E.) et KASSALITZKY (H.) - Arch. Pharm., 1962, 295, 37; C.A., 1962, 56, 11.710 i.

(122) - ULLMANN (E.) et KASSALITZKY (H.) - Dtsch. Apotheker-Ztg., 1967, 107, 152.

(123) - VÁGUJFALVI (D.) - Herba Hung., 1964, 3, 267.

(124) - VIGNOLI (L.), GUILLOT (J.), GOUEZO (F.) et CATALIN (J.) - Ann. pharm. fr., 1966, 24, 461 et 529.

(125) - VINCENT (D.), SEGONZAC (G.) et SESQUÉ (G.) - Ann. pharm. fr., 1959, 17, 241.

(126) - VINCENT (D.), STANISLAS (E.), ROUFFIAC (R.) et SOL (J.) - Toulouse Pharm., 1966, 13, n° 1, 37.

(127) - WALDI (D.), SCHNACKERZ (K.) et MUNTER (F.) - J. Chromatog., 1961, 6, 61.

(128) - WARTMANN-HAFNER (F.) - Pharm. Acta Helv., 1966, 41, 406.

(129) - WEAVER (W.J.) - J. Pharm. Sci., 1966, 55, 1111.

(130) - WEGH (A.), BUDVARI (R.), SZASZ (G.), BRANTNER (M.) et GRACZA (P.) - Acta Pharm. Hung., 1963, 33, 67; C.A., 1963, 59, 6199 e.

(131) - WILK (M.), HOPPE (V.), TAUPP (W.) et ROCHLITZ (J.) - J. Chromatog., 1967, 27, 311.

(132) - WULLEN (H.) et STAINIER (E.) - J. Pharm. Belg., 1967, 22, 291.

(133) - ZARNACK (J.) et PFEIFER (S.) - Pharmazie, 1964, 19, 216; C.A., 1964, 60, 15.680 e.

(134) - ZECHMEISTER (L.) et CHOLNOKY (L.V.) - Die Chromatographische Adsorptionanalyse, Ed. Vienne, 2e éd., 1938.

(135) - ZIELINSKA-SOWICKA (R.) et WOJCIK (E.) - Dissert. Pharm., (Varsovie), 1965, 17, 555.

Vu, Strasbourg, le 1er février 1968.
Le Président du Jury,
G.GAZET DU CHATELIER.

Vu et approuvé :
Strasbourg, le 8 février 1968.
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
M.HASSELMANN.

Vu et permis d'imprimer :
Strasbourg, le 8 février 1968.
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
M.HASSELMANN.

TABLE DES MATIÈRES

Page

INTRODUCTION 5

PREMIÈRE PARTIE : LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE ET SES APPLICATIONS AUX ALCALOÏDES.

Chapitre I - Travaux antérieurs et principe de la CCM 13

Chapitre II - Travaux personnels. Conditions expérimentales utilisées pour la CCM des alcaloïdes 17

DEUXIÈME PARTIE : LA CHROMATOGRAPHIE FONCTIONNELLE SUR COUCHE MINCE.

Chapitre I - Travaux antérieurs 25

Chapitre II - Principe et technique 27

Chapitre III - Travaux personnels. Principales transformations fonctionnelles utilisées 31

TROISIÈME PARTIE : EXTRACTION DES ALCALOÏDES À PARTIR DES PRÉPARATIONS GALÉNIQUES 41

QUATRIÈME PARTIE : APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE FONCTIONNELLE SUR COUCHE MINCE AUX DIFFÉRENTS GROUPES D'ALCALOÏDES.

Chapitre I - Alcaloïdes du groupe de l'atropine 49

Chapitre II - Alcaloïdes du groupe de la lobéline 63

Chapitre III - Alcaloïdes de l'opium et dérivés de synthèse. 71

Chapitre IV - Alcaloïdes des Ipécas 81

Chapitre V - Alcaloïdes du groupe de la strychnine 87

Chapitre VI - Alcaloïdes des Rauwolfia 95

Chapitre VII - Caféine 103

CINQUIÈME PARTIE : ANALYSE DES SIROPS ET DES SACCHARURES GRANULÉS CONTENANT DES ALCALOÏDES PAR MÉLANGE AVEC UN ADSORBANT CHROMATOGRAPHIQUE 111

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 117

BIBLIOGRAPHIE 121

TABLE DES MATIÈRES 129